

Untersuchungen zur Kontrolle
der PhiX174 Gen E Expression
und zum molekularen Mechanismus
der E-induzierten Lyse
von *Escherichia coli*

Udo Bläsi

Untersuchungen zur Kontrolle der PhiX174 Gen E Expression und
zum molekularen Mechanismus der E-induzierten Lyse
von Escherichia coli

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Udo Bläsi
aus Altenkirchen
München im Februar 1987

durchgeführt am
Institut für Genetik und Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. Werner Lubitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfhard Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 10.4.1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Für Susanne und meine Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0019

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln publiziert:

Bläsi U, Halfmann G, Lubitz W (1984) Induction of autolysis of *Escherichia coli* by PhiX174 gene E product. In: Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis. (Ed: Nombela C) Elsevier Science Publishers B.V. pp. 213-218

Bläsi U, Henrich B, Lubitz W (1985) Lysis of *Escherichia coli* by cloned PhiX174 gene E depends on its expression. J Gen Microbiol 131:1107-1114

Bläsi U, Lubitz W (1985) Influence of C-terminal modifications of PhiX174 lysis gene E on its lysis-inducing properties. J Gen Virol 66:1209-1213

Bläsi U, Harkness RE, Witte A, Halfmann G, Lubitz W (1986) Endogenous induction of bacterial lysis by cloned PhiX174 gene E product. In: Biological Properties of Peptidoglycan. (Ed: Seidl PH, Schleifer KH) Walter de Gruyter, Berlin u. New York pp.215-220

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie, der Universität Kaiserslautern begonnen und im Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München fortgesetzt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt:

- Herrn PD Dr. Werner Lubitz für die Ueberlassung des Themas, sein kontinuierliches Interesse am Fortgang der Arbeit, seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für viele wertvolle Anregungen.
- Frau Gaby Halfmann, Frau Angela Witte und Herrn Dr. Robin Harkness für ihre Zusammenarbeit und ständige Hilfsbereitschaft.
- Herrn Prof. Dr. Horst Schmieger und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und viele Anregungen.
- Herrn PD Dr. Reinhold Linke, Institut für Immunologie, Universität München, für seine zeitopfernde Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die vielen Anregungen bei den durchgeführten immunologischen Arbeiten, die die Gewinnung von Protein-E spezifischen Antikörpern sehr erleichtert haben.
- Herrn Prof. Dr. Uli von Specht, Institut für chirurgische Forschung, Universität München, für die anfängliche Hilfe bei den immunologischen Arbeiten.
- Herrn Dr. Ulrich Rütger, EMBL, Heidelberg, für die Ueberlassung von Plasmiden und Stämmen, sowie für die Einführung in die DNA Sequenzierung, für die ich mich auch bei Herrn Horst Mölders, EMBL, Heidelberg, bedanken möchte.
- Herrn Dr. Bernhard Henrich, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern, für die Ueberlassung von Plasmiden und für die Einführung in die Klonierungstechnik.
- Herrn Dr. Robert Seckler, MPI für Biologie, Tübingen, für seine Hilfe bei der Kopplung von Peptiden an Trägerproteine.

- Frau Dr. Susanne Modrow, Pettenkofer Institut, München. für die Computeranalysen zur Sekundärstruktur von Protein-E.
- Herrn Prof. Dr. Roland Plapp, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern, für seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft.
- Meinen Freunden Thomas Becker, Rolf Geisen, Rudi Berg und Andreas Zink für ihre Hilfe und Zusammenarbeit während des Studiums.
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für das gewährte Stipendium

Darüber hinaus gilt mein Dank all denen, sowohl im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern, als auch im Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABKÜRZUNGEN	3
I. EINLEITUNG	5
1. Genetik des Bakteriophagen PhiX174	5
2. Charakterisierung und Funktion von Protein-E	8
3. Zelluläre Voraussetzungen der E-Protein induzierten Lyse	10
4. Auswirkungen von Protein-E auf die Wirtszelle	11
5. Problemstellung	12
II. MATERIAL	14
1. Bakterien, Phagen, Plasmide	14
2. Medien	15
3. Puffer und Lösungen	16
4. Chemikalien	17
5. Enzyme	18
6. Synthetische Peptide	18
III. METHODEN	19
1. Mikrobiologische Methoden	19
1.1. Kulturbedingungen der Bakterien	19
1.2. Transformation von E. coli und Konservierung kompetenter Zellen	19
1.3. Vermehrung von PhiX174 und PhiX174am3	19
2. Präparation von DNA	21
2.1. Minilysate	21
2.2. Reinigung von DNA über Cäsiumchloridgradienten	21
2.3. Präparation von PhiX174 RF-DNA	22
2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA	22
3. Enzymreaktionen mit DNA	23
3.1. Verdau durch Restriktionsenzyme	23
3.2. Auffüllen von Einzelstrang DNA Enden	23
3.3. Ligation von DNA Fragmenten	24
3.4. Nick Translation	24
4. Isolierung und Reinigung von DNA Fragmenten	24
4.1. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	24
4.2. Isolierung von DNA aus PAA-Gelen	24
4.3. Chromatographie an BND Cellulose	25
5. Sequenzanalyse der DNA nach Maxam und Gilbert	25
6. Gelelektrophoresen	27
6.1. Elektrophorese von DNA	27
6.1.1. Agarosegele	27
6.1.2. PAA-Gele	27
6.1.3. Sequenzgele	28

	Seite
6.2. Elektrophorese von Proteinen	28
6.2.1. Autoradiographie und Fluorographie	29
6.2.2. Anfärbung der Proteinbanden im Gel	29
6.2.2.1. Coomassie Färbung	29
6.2.2.2. Silberfärbung	29
7. Proteinbestimmungen	30
7.1. Ninhydrinmethode	30
7.2. Absorptionsmessung bei 230 und 260 nm	30
8. Präparation von Minizellen	30
9. Markierung plasmidcodierter Proteine in Minizellen	31
10. Aufschluß von E. coli Zellen	32
10.1. Aufschluß durch Ultraschall	32
10.2. Aufschluß durch Lysozym und EDTA	32
11. Isolation der Membranfraktion von E. coli	32
12. Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität	33
13. Reinigung des lacZ-E' Genprodukts	33
13.1. Kopplung von TPEG an Sepharose 4b	33
13.2. Affinitätschromatographische Reinigung des β -Gal-E'-Fusionsproteins	34
14. Immunogenpräparation und Immunisierung	35
14.1. Peptid Kopplung mit Carbodiimid und Glutaraldehyd an Thyroglobulin	35
14.2. Peptid Kopplung mit Glutaraldehyd an Hämocyanin	36
14.3. Peptid Kopplung mit SPDP	36
14.3.1. Konjugation von Peptid A und Thyroglobulin	36
14.3.2. Konjugation der Peptide B und C mit Thyroglobulin	36
14.4. Bestimmung der Kopplungsrate durch HPLC Analyse nach SPDP Kopplung	37
14.5. Immunisierung	38
15. Antikörperpräparation	38
15.1. Gewinnung von Seren und IgG	38
15.2. Immobilisierte Peptide für die Affinitäts- chromatographie	39
15.3. Affinitätschromatographische Reinigung peptid- spezifischer Antikörper	39
15.4. Immobilisierung von Antikörpern für die Immunadsorption	40
16. Immunadsorption von Protein-E aus Zellmembranen von E. coli	40
17. Immunchemische Testsysteme	41
17.1. ELISA	41
17.2. Immunoblot	42
18. Quantifizierung von Proteinen	43
19. Computer Programme	43
19.1. Programme zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen ...	43
19.2. Programm zur Sekundärstrukturanalyse von m-RNA	43
IV. ERGEBNISSE	44
A. Kontrolle der Gen E Expression und der Protein-E Lyse .	44
1. Klonierung von Gen E unter der Transkriptions- kontrolle von Lambda pL	44
1.1. Konstruktion der Plasmide pSB12 und pSB22	45

	Seite
1.2.	Lyse von E. coli nach Gen E Expression von den Plasmiden pSB12 und pSB22 49
1.3.	Nachweis der plasmidcodierten Proteine von pSB12 und pSB22 51
1.3.1.	Sequenzanalyse der Plasmide pSB12 und pSB22 51
1.3.2.	Nachweis von Protein-E in E. coli K12 Δ HIAtrp 52
1.3.3.	Nachweis der plasmidcodierten Proteine von pSB12 und pSB22 in Minizellen 55
2.	Translationseffizienz von Gen lacZ in Abhängigkeit von der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle 59
2.1.	Konstruktion von Plasmid pSB85-1 60
2.2.	Konstruktion der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3 62
2.3.	Quantifizierung und Proteinnachweis von β -Galaktosidase nach Expression des lacZ Gens von den Plasmiden pSB85-1, pSB85-2 und pSB85-3 66
2.4.	Sekundärstrukturuntersuchungen der Lambda pL spezifischen m-RNA von Plasmid pSB12 und der PhiX174 spezifischen m-RNA Spezies XIII 69
3.	Einfluß der Gen D Expression auf die Translations-effizienz von Protein-E 74
3.1.	Konstruktion von Plasmid pSB35 74
3.2.	Lyse von E. coli nach Expression der Gene D und E von Plasmid pSB35 77
3.3.	Nachweis der plasmidcodierten Proteine von Plasmid pSB35 79
3.3.1.	Sequenzanalyse von Plasmid pSB35 79
3.3.2.	Quantifizierung der Protein-D und Protein-E Expression von Plasmid pSB35 im Vergleich mit der Protein-E Expression von Plasmid pSB12 80
4.	Einfluß von Protein-K auf die PhiX174 und Protein-E induzierte Lyse von E. coli 84
4.1.	Konstruktion von Plasmid pSB150 86
4.2.	Einfluß von Protein-K auf das Wachstum von E. coli 88
4.3.	Nachweis von Protein-K in E. coli 88
4.3.1.	Sequenzanalyse von Plasmid pSB150 88
4.3.2.	Nachweis von Protein-K in E. coli pop2135 90
4.3.3.	Nachweis von Protein-K in der Membranfraktion von E. coli DS410 91
4.4.	Einfluß von Protein-K auf die Lyse von E. coli durch PhiX174 94
4.5.	Einfluß von Protein-K auf die Protein-E Lyse 95
4.5.1.	Konstruktion von Plasmid pSB152 95
4.5.2.	Auswirkung von Protein-K auf die Protein-E Lyse 98
B.	Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse von E. coli 100
1.	Einfluß der Wachstumsphase von E. coli auf die Protein-E Lyse 100
2.	Funktionelle Stabilität von Protein-E 102
3.	Untersuchung der funktionellen Domänen von Protein-E 103
3.1.	Strukturbetrachtungen von Protein-E 103
3.2.	Konstruktion der Plasmide pSB1 und pSB4: Einfluß der Protein-E Domänen 3 und 4 auf das Lysepotential von Protein-E 108

	Seite
1.2.	Lyse von E. coli nach Gen E Expression von den Plasmiden pSB12 und pSB22 49
1.3.	Nachweis der plasmidcodierten Proteine von pSE12 und pSB22 51
1.3.1.	Sequenzanalyse der Plasmide pSB12 und pSB22 51
1.3.2.	Nachweis von Protein-E in E. coli K12 Δ HIA Δ trp 52
1.3.3.	Nachweis der plasmidcodierten Proteine von pSB12 und pSB22 in Minizellen 55
2.	Translationseffizienz von Gen lacZ in Abhängigkeit von der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle 59
2.1.	Konstruktion von Plasmid pSB85-1 60
2.2.	Konstruktion der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3 62
2.3.	Quantifizierung und Proteinnachweis von β -Galaktosidase nach Expression des lacZ Gens von den Plasmiden pSB85-1, pSB85-2 und pSB85-3 66
2.4.	Sekundärstrukturuntersuchungen der Lambda pL spezifischen m-RNA von Plasmid pSB12 und der PhiX174 spezifischen m-RNA Spezies XIII 69
3.	Einfluß der Gen D Expression auf die Translations-effizienz von Protein-E 74
3.1.	Konstruktion von Plasmid pSB35 74
3.2.	Lyse von E. coli nach Expression der Gene D und E von Plasmid pSB35 77
3.3.	Nachweis der plasmidcodierten Proteine von Plasmid pSB35 79
3.3.1.	Sequenzanalyse von Plasmid pSB35 79
3.3.2.	Quantifizierung der Protein-D und Protein-E Expression von Plasmid pSB35 im Vergleich mit der Protein-E Expression von Plasmid pSB12 80
4.	Einfluß von Protein-K auf die PhiX174 und Protein-E induzierte Lyse von E. coli 84
4.1.	Konstruktion von Plasmid pSB150 86
4.2.	Einfluß von Protein-K auf das Wachstum von E. coli 88
4.3.	Nachweis von Protein-K in E. coli 88
4.3.1.	Sequenzanalyse von Plasmid pSB150 88
4.3.2.	Nachweis von Protein-K in E. coli pop2135 90
4.3.3.	Nachweis von Protein-K in der Membranfraktion von E. coli DS410 91
4.4.	Einfluß von Protein-K auf die Lyse von E. coli durch PhiX174 94
4.5.	Einfluß von Protein-K auf die Protein-E Lyse 95
4.5.1.	Konstruktion von Plasmid pSB152 95
4.5.2.	Auswirkung von Protein-K auf die Protein-E Lyse 98
B.	Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse von E. coli 100
1.	Einfluß der Wachstumsphase von E. coli auf die Protein-E Lyse 100
2.	Funktionelle Stabilität von Protein-E 102
3.	Untersuchung der funktionellen Domänen von Protein-E 103
3.1.	Strukturbetrachtungen von Protein-E 103
3.2.	Konstruktion der Plasmide pSB1 und pSB4: Einfluß der Protein-E Domänen 3 und 4 auf das Lysepotential von Protein-E 108

3.2.1.	Lysepotential der pSB1 und pSB4 codierten Fusionsproteine E'-z' und E'-a'	112
3.3.	Konstruktion von Plasmid pSB86-6: Einfluß von Protein-E Domäne 2 auf den funktionellen Zustand des E'- β -Gal-Fusionsproteins	115
3.3.1.	Lysepotential des pSB86-6 codierten Protein-E spezifischen Fusionsproteins	117
C.	Protein-E spezifische Antikörper	119
1.	Konstruktion eines lacZ-E' Hybridgens und Reinigung des entsprechenden Fusionsproteins	119
1.1.	Konstruktion von Plasmid pSB10	119
1.2.	Bestätigung des lacZ-E' Uebergangs in Plasmid pSB10 ...	123
1.3.	Reinigung des β -Gal-E'-Hybridproteins durch Affinitätschromatographie	125
2.	Synthetische Peptide mit Homologie zur Aminosäuresequenz von Protein-E	126
2.1.	Auswahl der synthetischen Peptide aus der Aminosäuresequenz von Protein-E	126
2.2.	Kopplung der synthetischen Peptide an Trägerproteine ..	129
2.2.1.	Bestimmung der Kopplungsrate mit SPDP an Thyroglobulin gebundener Peptide	130
3.	Peptid- und β -Gal-E'-Fusionsprotein spezifische Antikörper	131
3.1.	Reaktivität von Antipeptidantiserum A3 mit dem β -Gal-E'40 Fusionsprotein	133
4.	Reaktivität der Antikörper mit Protein-E	134
4.1.	Immunadsorption von Protein-E an immobilisierten Antipeptidantikörper A3	135
4.1.1.	Gelelektrophoretischer Nachweis von Protein-E nach Immunadsorption	136
4.1.2.	Nachweis von Protein-E mit anti β -Gal-E' Antiserum	138
D.	Konstruktion von Klonierungsvektoren mit Protein-E Lysefunktion zum schonenden Aufschluß von E. coli	140
1.	Konstruktion von Plasmid pSB50	140
2.	Konstruktion von Plasmid pSB51	145
3.	Protein-E spezifische Freisetzung von β -Galaktosidase als Anwendungsbeispiel	147
V.	DISKUSSION	150
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	160
	ANHANG	

ZUSAMMENFASSUNG

Die Lyse von *E. coli* nach Infektion mit dem Bakteriophagen PhiX174 ist von der Synthese des phagencodierten Protein-E abhängig. Da Gen E auf allen PhiX174 spezifischen m-RNA Klassen vorkommt, ist zur Verhinderung der frühzeitigen Lyse nach Phageninfektion eine strenge Expressionskontrolle für Gen E notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Kontrolle der Gen E Expression und zum molekularen Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse lieferten folgende Ergebnisse:

- Nach Klonierung und kontrollierter Expression von Gen E und eines Gen E amber Allels, konnte Protein-E durch den Vergleich markierter Proteine in *E. coli* und *E. coli* Minizellen nachgewiesen werden.
- Durch Austausch der lacZ spezifischen Ribosomenbindungsstelle mit der von Gen E ergab sich eine starke Reduktion der Bildung von β -Galaktosidase. Dies zeigte, daß die Kontrolle der Gen E Expression auf translationaler Ebene liegt.
- Untersuchungen von E-spezifischen m-RNA's, die von PhiX174 Promotoren starten oder von Plasmiden transkribiert werden, ergaben keine Hinweise für eine Maskierung der Gen E Ribosomenbindungsstelle.
- Die Gen E Expression war durch gleichzeitige Expression des Überlappenden Gens D kaum beeinträchtigt. Eine translationale Kopplung beider Gene konnte ausgeschlossen werden.
- Nach Klonierung von PhiX174 Gen K, konnte Protein-K in der Membranfraktion von *E. coli* nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß Protein-K die PhiX174 Lyse verzögert und zur Steigerung der Anzahl an Nachkommenphagen beiträgt. Dagegen hatte Protein-K keinen Einfluß auf die Protein-E induzierte Lyse.
- Zur Charakterisierung der zur Lyseinduktion notwendigen Protein-E Regionen wurden zunächst theoretische Untersuchungen zur Sekundärstruktur des Proteins durchgeführt. Die computergestützten Analysen erlaubten die Unterteilung von Protein-E in 4 verschiedene Domänen mit geordneten Strukturen (α -Helix; β -Faltblatt).
- Aufgrund dieser Vorhersagen wurden gezielt Fusionsgene zwischen N-terminal codierenden Sequenzen von Gen E und der 5' codierenden Sequenz des lacZ Gens (α -Teil der β -Galaktosidase), sowie mit

unspezifischen DNA Sequenzen konstruiert. Nach Ueberprüfung dieser Fusionsproteine auf ihre lytische Wirkung für *E. coli*, konnte nachgewiesen werden, daß die ersten 51 N-terminalen Aminosäuren (Protein-E Domänen 1 und 2) von Protein-E die funktionelle Protein-E Region, die zur Lyseinduktion notwendig ist, beinhalten.

- Durch Konstruktion eines weiteren Hybridgens zwischen den ersten 30 N-terminalen Codons von Gen E und dem lacZ Gen konnte gezeigt werden, daß Protein-E Domäne 1 in diesem Fusionsprotein eine letale Wirkung (keine Lyse) auf die Zellen ausübt.
- Die durchgeführten Fusionsstudien erhellten auch die Funktionen der Protein-E Domänen 3 und 4. Aus diesen Untersuchungen wurde abgeleitet, daß nur Oligomerisierungsstrukturen die Protein-E Domänen 3 und 4 funktionell ersetzen können und daß die Protein-E Lyse die Bildung von Protein-E spezifischen Oligomeren voraussetzt.

- Zum Nachweis von Protein-E und von möglichen Protein-E Oligomeren wurden Protein-E spezifische Antikörper hergestellt. Diese waren entweder gegen synthetische E-spezifische Peptide oder gegen ein lacZ-E' Fusionsprotein gerichtet.

- Affinitätschromatographisch gereinigte Anti-peptidantikörper wurden an Sepharose immobilisiert und zur Immunadsorption von Protein-E aus solubilisiertem Membranmaterial verwendet.

- Das gewonnene anti β -Gal-E' Antiserum reagierte mit den immunadsorbierten Protein-E Proben. Im Immunoblot solcher Proben konnten Protein-E spezifische Oligomere nachgewiesen werden.

- Aus den Untersuchungen ergibt sich folgendes Modell zum molekularen Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse von *E. coli*. Protein-E Oligomere bilden eine transmembrane Tunnelstruktur, wobei die Protein-E Domänen 1 und 2 transmembrane Bereiche darstellen und die Domänen 3 und 4 für die Oligomerisierung bzw. Positionierung der Tunnelstruktur notwendig sind.

- Zum schonenden Aufschluß von *E. coli* durch Protein-E Lyse und der damit verbundenen Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile wurden zwei Klonierungsvektoren konstruiert, die neben der kontrollierten Gen E Expression die Klonierung und die kontrollierte Expression von Genen, deren Genprodukt freigesetzt werden soll, erlauben.

ABKÜRZUNGEN

am	amber
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BND-	Benzoyl-Naphtoyl-DEAE-
bp	Basenpaare
β -Gal	β -Galaktosidase
C	Grad Celcius
Ci	Curie
cfu	colony forming units
cpm	counts per minute
CTP	Cytosintriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOD	Dodecyl- β -D-maltosid
DTE	Dithioeritol
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)- carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kd	kilo dalton
KLH	Keyhole limpet Hämocyanin
l	Liter

lac	Lactose
lac i	lac-Repressor Gen
lac o	lac-Operator
lac p	lac-Promotor
lac Z	β -Galactosidase Gen
Lambda pL	Lambda linksseitiger Promotor
M	molar
m	Milli-
u	Mikro-
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
m-RNA	messenger RNA
n	Nano
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactosid
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pfu	plaque forming units
POPOP	1,4,-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol) Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionat
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Thyroglobulin
TPEG	p-Aminophenyl- β -D-Thiogalactosid
t-RNA	transfer RNA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-Indolyl- β -D-Galactosid

I. EINLEITUNG

1. Genetik des Bakteriophagen PhiX174

Der Bakteriophage PhiX174 besitzt einzelsträngige ringförmig geschlossene DNA (Sinsheimer 1959; Freifelder et al. 1964; Sinsheimer 1968; Benbow et al. 1971). Das PhiX174 Genom wurde vollständig sequenziert (Sanger et al. 1977; Sanger et al. 1978). Es hat eine Länge von 5386 Basenpaaren und codiert 11 Gene. Mit Ausnahme von Genprodukt E und Genprodukt K dienen alle übrigen Genprodukte entweder der PhiX174 DNA Replikation oder repräsentieren Strukturproteine des Phagencapsides (Abb.1; Tab.1).

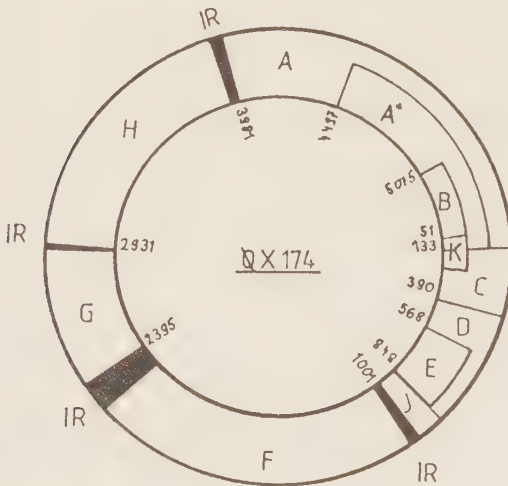


Abb.1: Genomorganisation von PhiX174

Die Gene sind durch Großbuchstaben, die nicht codierenden Bereiche mit IR (intercistronische Region) gekennzeichnet. Die Zahlen im Kreisinnern geben den Translationsstart der jeweiligen Gene an (Sanger et al. 1978; Kornberg 1982).

Tab.1: PhiX174 Gene und Funktionen

Gen	Proteinfunktion	Molekulargewicht(kd)
		SDS-Gel
A	RF-Replikation; Synthese einzelsträngiger DNA; Einzelstrang spezifische Endonuklease	59,0
A*	Abschalten der Wirts-DNA Synthese	37,0
B	Morphogenese des Capsides	20,0
C	DNA Reifung	7,0
D	Morphogenese: Gerüstprotein des Capsides	16,0
E	Lyse der Wirtszellen	10,0
F	Capsidprotein	48,0
G	Haupt-Spikeprotein	19,0
H	Spikeprotein; Phagenadsorption; Pilotprotein für PhiX174 DNA	37,0
J	DNA Kondensierung; Coreprotein	5,0
K	"Burst size"	6,0

Nach: Barrell et al. 1976; Tessman und Tessman 1978; Tessman et al. 1980; Kornberg 1982; van Mansfeld 1982; Gillam et al. 1985; Hamatake et al. 1985;

Genprodukt E stellt das Lyseprotein von PhiX174 dar. Die Protein-E induzierte Lyse terminiert den PhiX174 Infektionszyklus und es kommt zur Freisetzung der Nachkommenphagen (Hutchison und Sinsheimer 1966).

Die spezifische Funktion von Genprodukt K ist nicht bekannt.

Phänotypisch zeigen PhiX174amK Mutanten gegenüber PhiX174wt eine reduzierte "burst size" der Nachkommenphagen (Tessman et al. 1980; Gillam et al. 1985). Dies wies auf eine mögliche antagonistische Funktion von Protein-K in der Protein-E Lyse hin. Der Einfluß von Protein-K auf die Protein-E Lyse wurde in dieser Arbeit untersucht.

Auf der PhiX174 DNA sind mehrere Gene überlappend codiert (Abb.1). So liegen die Gene B, K und E innerhalb der DNA-Sequenzen von Gen A bzw. Gen D (Sanger et al. 1978). Die in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Gene E und K werden mit einem +1 Leseraster zu den Genen D (Barrell et al. 1976) bzw. A (Shaw et al. 1978) translatiert.

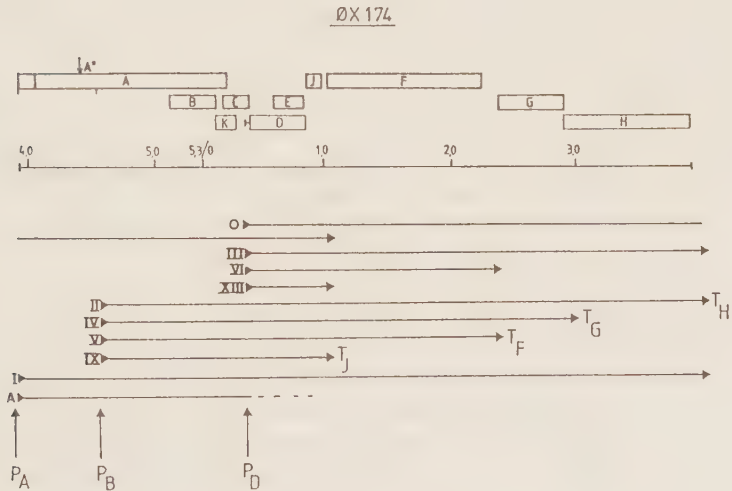


Abb.2: In vivo Transkriptionskarte von PhiX174

Die Skala unterhalb der entsprechend ihrem Leseraster eingezeichneten PhiX174 Gene gibt die Nukleotidpositionen auf der PhiX174 DNA an (Sanger et al. 1978). Die Pfeile I - XIII und A, O repräsentieren die verschiedenen in vivo Transkripte von der PhiX174 DNA. Die Genomlokalisierung der 3 PhiX174 spezifischen Promotoren (PA, PB, PD) und der 4 Terminatoren (TF, TG, TH, TJ) ist dargestellt (Hayashi und Hayashi 1981).

Die Transkription PhiX174 spezifischer m-RNA geht von 3 Hauptpromotoren aus (Chen et al. 1973), die aufgrund ihrer Lokalisation vor den entsprechenden Genen mit PA, PB und PD (Abb.2) bezeichnet werden. Von diesen Promotoren werden in vivo 10 verschiedene polycistronische m-RNA Spezies (Abb.2) synthetisiert (Clements und Sinsheimer 1975; Hayashi et al. 1976). Diese m-RNA Spezies sind mit Halbwertszeiten zwischen 4,5 und 11 min strukturell stabil (Hayashi und Hayashi 1981b; Hayashi und Hayashi 1985). Innerhalb der 4 intercistronischen Regionen (Abb.1) wurden bisher 4 verschiedene Terminatoren der Transkription gefunden, die jedoch unterschiedliche Terminationseffizienz aufweisen (Hayashi et al. 1981a). Dies hat zur Folge, daß alle PhiX174 Gene auf mehreren Transkripten vorkommen (Abb.2). Im Gegensatz zu anderen Phagen kann während der PhiX174 Transkription nicht zwischen frühen und späten m-RNA's unterschieden werden. Eine zeitliche Regulation der Transkription von PhiX174 Genen scheint somit nicht aufzutreten. Gen E kommt auf allen PhiX174 m-RNA Spezies vor (Abb.2). Zur Lyse der Wirtszellen scheinen nur wenige Protein-E Moleküle auszureichen (Pollock et al. 1978). Um die frühzeitige Lyse im Infektionszyklus zu verhindern, ist daher entweder eine strenge Translations- oder Funktionskontrolle für Gen E notwendig. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Kontrolle der Gen E Translation näher zu untersuchen.

2. Charakterisierung und Funktion von Protein-E

Die notwendige Rolle von Protein-E im Lyseprozeß wurde erstmalig 1966 aufgrund von lyse-negativen PhiX174 Mutanten beschrieben (Hutchison und Sinsheimer 1966). Ein Vertreter dieser Mutanten PhiX174am3 konnte sich zwar in E. coli normal vermehren und reife Nachkommenphagen bilden, war aber nicht mehr in der Lage den Wirt zu lysieren. PhiX174am3 weist in Gen E einen Basenaustausch in der 2. Position des 7. Codons auf. Ein G ist gegen A ausgetauscht, wodurch ein Stoppcodon im Leseraster von Gen E entsteht. Die Aminosäuresequenz des unterliegenden Gens D wird dagegen nicht beeinflusst (Barrell et al. 1976). 1972 konnte Gen E auf der Genkarte von PhiX174 lokalisiert werden (Benbow et al. 1972). Durch Klonierung von Gen E wurde gezeigt, daß für die Lyse von E. coli die alleinige Wirkung von Protein-E ausreicht und für diesen Prozeß keine anderen Phagenprodukte

benötigt werden (Henrich et al. 1982a; Young und Young 1982). Nach Analyse des Proteinstusters von PhiX174 und PhiX174am3 infizierten Zellen konnte Protein-E nachgewiesen werden (Pollock et al. 1978). Durch Vergleich der Intensität der Proteinbanden von Protein-D und E wurde geschlossen, daß pro infizierter Zelle nur ungefähr 100-300 Protein-E Moleküle vorkommen (Pollock et al. 1978).

Protein-E stellt ein basisches Protein dar (isoelektrischer Punkt: 9,84), das aus 91 Aminosäuren besteht und dessen N-Terminus große Ähnlichkeiten mit sogenannten Signalsequenzen hat (Barrell et al. 1976; Young und Young 1982).

Protein-E konnte nach Phageninfektion (Altman et al. 1985) und nach Expression von kloniertem Gen E (Bläsi et al. 1983) in der inneren und äußeren Membran von E. coli nachgewiesen werden. Dabei wurden keine Hinweise für die Abspaltung einer möglichen Protein-E spezifischen Signalsequenz gefunden.

Bisher konnte keine enzymatische Aktivität von Protein-E festgestellt werden (Denhardt und Sinsheimer 1965; Markert und Zillig 1965).

Der Sequenzvergleich der Lyseproteine von PhiX174 und dem nahe verwandten Phagen G4 zeigte, daß in beiden Proteinen der hydrophobe N-Terminus stark konserviert ist (Sanger et al. 1978; Godson 1978). Mutationen, die den N-terminalen Bereich von Protein-E betreffen, wirken lyseverzögernd oder verhindern die Lyse (Barrell et al. 1976; Buckley und Hayashi 1986). Die Lyseproteine von PhiX174 und dem nahe verwandten Phagen S13 unterscheiden sich nur in der Aminosäureposition 89 (Lau und Spencer 1985). Durch Untersuchungen mehrerer amber Mutanten im Gen E von S13 wurde nachgewiesen, daß vorzeitiger Kettenabbruch im C-terminalen Bereich von Protein-E die Lysefunktion nicht beeinträchtigt (Tessman und Tessman 1978).

Zur Untersuchung der funktionellen Protein-E Region (Lyse-auslösend) sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Gen E Sequenzen, die für unterschiedliche Protein-E Domänen codieren, kloniert werden. Der Funktionstest neu konstruierter E-spezifischer Fusionsproteine sollte zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Protein-E Lyse beitragen.

3. Zelluläre Voraussetzungen der Protein-E induzierten Lyse

Die Protein-E induzierte Lyse von *E. coli* ist vom physiologischen Zustand der Wirtszelle abhängig. Nach Phageninfektion oder nach Expression von kloniertem Gen E bestimmt die Wachstumsrate der Wirtszellen den Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Lyserate. Die Protein-E Lyse ist in Zellen, die sich gegen Ende der logarithmischen oder am Anfang der stationären Wachstumsphase befinden, entweder stark verzögert oder nicht möglich (Denhardt und Sinsheimer 1965; Lubitz et al. 1984a).

E. coli *lytA* Mutanten (Harkness und Ishiguro 1983) sind gegen die Wirkung von Protein-E tolerant (Lubitz et al. 1984b). Dieser Befund wies auf die Notwendigkeit eines intakten Autolysesystems für die Protein-E Lyse hin, ohne daß die nähere Voraussetzung dafür bekannt war. Die endogene Lyse durch Protein-E und die künstliche Autolyse durch EDTA (Leduc und Heijenoort 1980) weisen eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. Beide Vorgänge sind vom pH Wert des Außenmediums, dem physiologischen Zustand der Zellen, der Konzentration 2-wertiger Kationen (Magnesiumsulfat) und der Osmolarität des Kulturmediums abhängig. Die Protein-E Lyse und die externe Autolyse kann durch 50 mM Magnesiumsulfat oder 20% Saccharose fast vollständig verhindert werden (Markert und Zillig 1965; Leduc und Heijenoort 1980; Lubitz et al. 1984a).

Allerdings können *E. coli* Mutanten, die gegen EDTA induzierte Autolyse teilweise resistent sind (Leduc et al. 1984), sowie Penicillin tolerante Mutanten (Shimmin et al. 1984), durch Protein-E lysiert werden (Halfmann et al. 1984; Halfmann und Lubitz 1986). Letztere Untersuchungen sprechen gegen einen gemeinsamen Mechanismus der endogenen Lyse durch Protein-E und der Autolyseinduktion von außen. Möglicherweise unterliegen beide Vorgänge jedoch gemeinsamen regulatorischen Faktoren, deren Funktionen zur Zeit noch unbekannt sind (Halfmann und Lubitz 1986).

Zur Induktion der Protein-E induzierten Lyse wird eine kritische zelluläre Konzentration des Lyseproteins benötigt. Diese Aussage basiert einerseits auf Expressionsstudien von Gen E unter der Kontrolle des *lac* Promotors. Danach war der Lysebeginn von der Konzentration des Induktors (IPTG) abhängig (Henrich et al. 1982a). Andererseits kann die Protein-E Lyse durch Zugabe von Chloramphenicol oder Rifampicin zu frühen Zeiten nach Induktion der Expression von kloniertem Gen E (Halfmann 1983) oder nach

Eintritt der phageninduzierten Lyse (Halfmann und Lubitz 1986) verhindert werden.

Wie erwähnt, konnte Protein-E in der inneren und äußeren Membran von *E. coli* nachgewiesen werden. Experimente mit Entkopplern wiesen auf die Notwendigkeit einer energetisierten Membran für die Integration von Protein-E hin (Witte 1985; Witte et al. 1987). Ferner ist die Protein-E Lyse von der Lipidzusammensetzung der Membranen abhängig (Wadle et al. 1986). Somit scheint hinreichend bewiesen zu sein, daß die Integration von Protein-E in die innere und äußere Membran von *E. coli* eine notwendige Voraussetzung für den Lyseprozeß darstellt.

4. Auswirkungen von Protein-E auf die Wirtszelle

In der Mitte des PhiX174 Infektionszyklus setzt der Abbau von neu synthetisiertem Murein ein. Die chromatographische Analyse der Mureinspaltprodukte zeigte, daß an der Spaltung des Peptidoglycans mindestens 2 Enzyme, eine Endopeptidase und eine Endoglucosidase beteiligt sind. Da sowohl Bindungen im Polysaccharidanteil, als auch im Peptidanteil des Mureins gespalten werden, ist es unwahrscheinlich, daß ein kleines Protein wie E beide Funktionen erfüllen kann (Lubitz und Plapp 1980). Im Gegensatz dazu wurde nach Expression von kloniertem Gen E durch HPLC-Analyse des Mureins und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Peptidoglycansacculi lysierter Zellen festgestellt, daß durch alleinige Wirkung von Protein-E kein Mureinabbau erfolgt (A. Witte, pers. Mitteilung). Die Expression von kloniertem Gen E führt zum Zeitpunkt der Lyse zur Stimulation von Phospholipaseaktivität und zur Veränderung der Phospholipidzusammensetzung in den Zellmembranen. Diese Veränderungen stellen jedoch für die Protein-E Lyse keine notwendige Voraussetzung dar, da auch Phospholipase-Mutanten von *E. coli* durch Protein-E in gleichem Maße lysiert werden können. Die beobachtete Phospholipasestimulation kann deshalb als ein Sekundäreffekt der Membranintegration von Protein-E angesehen werden. (Lubitz und Pugsley 1985).

Sowohl elektronenmikroskopische Aufnahmen von lysierten Zellen nach PhiX174 Infektion (Markert und Zillig 1965), als auch lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen nach Protein-E Lyse (Henrich und Plapp 1984) zeigten keine Veränderungen der Zellmorphologie. Die Zellen erscheinen lediglich optisch leer.

Untersuchungen zur Physiologie der PhiX174 und Protein-E Lyse ergaben, daß der Zusammenbruch des Membranpotentials, das Ausfließen von Ionen und Proteinen sowie die zelluläre Lyse gleichzeitig eintreten (Witte et al. 1987).

5. Problemstellung

Kontrolle der Gen E Expression:

- Durch Klonierung von Gen E unter die Transkriptionskontrolle von Lambda pL sollte die Gen E Expression kontrolliert erfolgen und die E-spezifische Lyse optimiert werden.
- Die relative Stärke der Gen E spezifischen Ribosomenbindungstelle sollte durch Klonierung vor das lacZ Gen bestimmt werden.
- Die Expression der überlappenden Gene D und E sollte gemeinsam von einem kontrollierbaren Promotor erfolgen. Dabei sollte der Einfluß der simultanen Gen D Translation auf die Gen E Translation überprüft werden.

Protein-K Effekt auf die E-spezifische und PhiX174 Lyse:

- Gen K sollte kloniert, die zelluläre Lokalisation des Genproduktes nachgewiesen und der Einfluß von Protein-K auf die Protein-E Lyse und Phagenlyse näher untersucht werden.

Molekularer Mechanismus der Protein-E Lyse:

- Durch Expression von Gen E in Minizellen sollte die Auswirkung von Protein-E auf stationäre Zellen untersucht werden.
- Die funktionelle Stabilität von Protein-E sollte zeitabhängig und durch Einsatz von Transkriptions- und Translationsinhibitoren untersucht werden.
- Durch Konstruktion verschiedener Hybridproteine sollte der Einfluß von unterschiedlichen Protein-E Domänen auf das Lysepotential von Protein-E bestimmt werden.

Nachweis von Protein-E mit Hilfe von Antikörpern:

- Antikörper gegen Protein-E sollten in Kaninchen mit Hilfe von synthetischen Peptiden sowie gegen ein β -Gal-E'-Fusionsprotein hergestellt werden.
- Mit Hilfe der so gewonnenen Antikörper sollte versucht werden Protein-E immunologisch nachzuweisen.

Methode zum schonenden Aufschluß von E. coli:

- Es sollten Plasmide konstruiert werden, die eine optimale Expression des Lysegens unter Lambda pL und die Klonierung eines beliebigen Gens unter die Kontrolle eines weiteren Promotors ermöglichen.

II. MATERIAL

1. Bakterien, Phagen, Plasmide

Bakterien:

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Herkunft</u>
E. coli K12:		
K12 Δ HI Δ trp	SmR, lacZam, Δ bio-uvrB, Δ trpEA2 (Lambda Nam7, Nam53, cI857, Δ H1)	E. Remaut, Gent (Remaut et al. 1981)
DS410	minA, minB, strR, lacY, xyl, mtl, thi, recA	W. Klipp, Bielefeld (Sheratt 1977)
CAIQ1	(lac pro) Δ , thi, cap-, cya-, strA, recA, F' lac iql lac+ pro+	U. Rüther, Heidelberg (Henrich et al. 1982a)
F ⁻ z ⁻ Δ M15recA	(lac pro) Δ , thi, Phi80dlacZ M15 ara, strA, recA	U. Rüther, Heidelberg (Rüther et al. 1981)
MC1061	araD139, Δ (ara, leu)7697, Δ lacx74, galU, galK, hsdR, hsm+, strA	M. J. Casadaban, Stanford (Casadaban und Cohen 1980)
pop2135	endA, thi, hsdR, malT, cI857, Lambda pR, malPQ	O. Raibaud, Paris
PC1331	thi, metE, trpE, purE, proC, leu, lacZ, xyl, ara, mtl, tonA, tsx, phx, azi, strA, recA1, supE	Phabagen Coll., Utrecht
PC2169	thi, trpR, dellac (1am, cI857, S7) phx	Phabagen Coll., Utrecht
E. coli C:		
PC1363	pheA	Phabagen Coll., Utrecht
HF4714	pro, arg, leu, his, thy, thr, su+	R. Hess, Heidelberg (Johnson und Sinsheimer 1974)

Bakteriophagen:

<u>Phage</u>	<u>Herkunft</u>
PhiX174	Laborsammlung
PhiX174am3	Laborsammlung

Plasmide:

<u>Plasmid</u>	<u>Herkunft</u>
pLc236	E. Remaut, Gent (Remaut et al. 1981)
pLa2311	E. Remaut, Gent (Remaut et al. 1981)
pcI857	E. Remaut, Gent (Remaut et al. 1983)
pUH12	B. Henrich, Kaiserslautern (Henrich et al. 1982a)
pUH22	B. Henrich, Kaiserslautern (Henrich et al. 1982a)
pUR222	U. Rüther, Heidelberg (Rüther et al. 1981)
pUR290	U. Rüther, Heidelberg (Rüther und Müller-Hill 1983)
pSU1	A. Schüller, Kaiserslautern (Schüller et al. 1985)
pMC1403	M. J. Casadaban, Stanford (Casadaban et al. 1980)

2. Medien

LB-Medium: 10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, ad 1 l dest Wasser;

M9-Medium: 6 g Dinatriumhydrogenphosphat, 4,5 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g Natriumchlorid, 1 g Ammoniumchlorid, 1 ml Magnesiumsulfat (1 M), 10 ml Glucose (1 M), ad 1 l dest. Wasser;
Stocklösungen von Magnesiumsulfat und Glucose getrennt autoklavieren.

DM-Medium: 10,5 g Dikaliumhydrogenphosphat, 4,5 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1 g Ammoniumsulfat, 0,3 g Trinatriumcitrat, 1 ml Magnesiumsulfat (1 M), 10 ml Glucose (50%), 0,5 ml Thiaminhydrochlorid (10 mg/ml), ad 1 l dest. Wasser;
Stocklösungen getrennt autoklavieren.

CY-Medium: 10 g Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid, ad 1 l dest. Wasser;

Methionin-Assay-Medium: Fertigmedium (Difco Labs, Detroit)

Je nach unterschiedlicher Resistenz der plasmidtragenden Stämme wurden die entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben:
Ampicillin: 0,2 mg/ml; Kanamycin: 0,05 mg/ml; Tetracyclin: 0,015 mg/ml;

Zur Herstellung von Agarplatten wurde 16 g/l Agar zugesetzt.

X-Gal Platten: 1 l LB-Agar, 1 ml IPTG (1 M), 1 ml X-Gal
(40 mg/ml in Dimethylformamid)

Mc.-Conkey Platten: Fertigmedium (Difco Labs, Detroit)

3. Puffer und Lösungen

- TEE-Puffer 50 x : 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,2
- TBE-Puffer 10 x : 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,3
- TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,02 mg/ml Ribonuklease, pH 8,0
- Lämmli-Reservoirpuffer: 25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS, pH 6,8
- Sammelgelpuffer 4 x : 0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8
- Trenngelpuffer 4 x : 1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8
- Acrylamid / Bisacrylamid: 30 g : 0,8 g
- PBS-A 10 x : 0,15 M Natriumchlorid, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH 7,2
- PBS-B 1 x : 0,14 M Natriumchlorid, 3 mM Kaliumchlorid, 8 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 8,5
- Transblotpuffer: 25 mM Tris, 0,15 M Glycin, 20% Methanol, pH 8,3
- Borat-Saline: 0,1 M Borsäure, 25 mM Dinatriumtetraborat,
75 mM Natriumchlorid, pH 8,5
- Substratpuffer: 50 mM Natriumcarbonat, 2mM Magnesiumsulfat, pH 9,5
(ELISA)
- Protein-Probepuffer: 25 mM Tris, 20% Glycerin, 3% β -Mercaptoethanol, 3% SDS, 0,05% Bromphenolblau, pH 6,8
- DNA-Probepuffer 5 x : 50 mM Tris, 25% Saccharose, 0,1% SDS,
0,05% Bromphenolblau, pH 8,2
- Z-Puffer: 40 mM Natriumdihydrogenphosphat, 60 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 10 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumsulfat,
50 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0
- M9-Salz 1 x : 6 g Dinatriumhydrogenphosphat, 4,5 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g Natriumchlorid, 1 g Ammoniumchlorid,
ad 1 l dest. Wasser;
- Szintillationscocktail: 8,65 g PPO, 21 g POPOP, Toluol ad 2,5 l;

Reagenzien zur DNA Sequenzierung:

- Probepuffer: 80% Formamid, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau, pH 8,3
- DMS-Puffer: 50 mM Natriumcacodylat, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EDTA, pH 8,0
- DMS-Stop: 1,5 mM Natriumacetat, 1 mM β -Mercaptoethanol, 4 μ g/ml t-RNA
- Carrier-DNA: Heringssperma 1mg/ml
- Hydrazin-Stop: 0,3 M Natriumacetat (pH 7,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 25 μ g/ml t-RNA

4. Chemikalien

Säulenmaterial: DEAE-Cellulose, CH-Sepharose 4b, aktivierte Sepharose 4b, Thiopropyl-Sepharose 6b und PD-10 Sephadex G-25M (Fertigsäulen) wurden von Pharmacia, Uppsala, bezogen.
BND-Cellulose: Serva, Heidelberg
ACA-44 Ultrogel: LKB, Broma

SPDP: Pharmacia, Uppsala

Silan GF-31: Wacker Chemie, München

Dodecyl- β -D-maltosid: Fluka, Neu Ulm

Bio-Rad Silverstain: Bio Rad, Richmond

Markerproteine für die SDS-PAGE: Serva, Heidelberg

Radiochemikalien:

35-S-Methionin (1023 Ci/mmol): New England Nuclear Corp., Boston

3-H-Aminosäuremix: Ammersham Buchler, Braunschweig

3-H-Leucin (120-190 Ci/mmol): Ammersham Buchler, Braunschweig

14-C-Markerproteine: Carboanhydrase (30 kd), Trypsin-inhibitor (21,5 kd), Cytochrom C (12,5 kd), Aprotinin (6,5 kd), Insulin (3,4 kd u. 2,3 kd), Ammersham Buchler, Braunschweig

alpha-32-P-dATP (3000 Ci/mmol): Ammersham Buchler, Braunschweig

Immunchemikalien:

Freund's Adjuvans: Difco Labs, Detroit

Antikaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat: Sigma, München

Antikaninchenantikörper-biotinyliert und Streptavidin
biotinylierter Peroxidase Komplex: Ammersham Buchler, Braunschweig

Alle übrigen verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind handelsübliche
Produkte der Firmen Merck, Serva, Sigma, Fluka, Wacker Chemie und
Böhringer.

5. Enzyme

β -Galaktosidase: Sigma, München

DNA-Polymerase I, Klenow Fragment, T4-Ligase: Böhringer, Mannheim

Exonuklease VII: BRL, Neu-Isenburg

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen
bezogen: Böhringer, Renner, Biolabs und BRL

6. Synthetische Peptide

Die Peptide aus der Aminosäuresequenz von Protein-E wurden von der
Firma Organogen, Heidelberg, nach dem Merrifield Verfahren syn-
thetisiert und durch HPLC Chromatographie analysiert.
Folgende Hepta- und Octapeptide wurden käuflich erworben:

Peptid A: Tyr-Lys-Lys-Thr-Cys-Val-Lys

Peptid B: Lys-Asn-Tyr-Val-Arg-Lys-Glu

Peptid C: Tyr-Lys-Asn-Phe-Val-Arg-Lys-Glu

III. METHODEN

1. Mikrobiologische Methoden

1.1. Kulturbedingungen der Bakterien

Nach Ueberprüfung der genetischen Marker der verwendeten Stämme wurden Einzelkolonien in 1-5 ml Flüssigmedium über Nacht unter Belüftung inkubiert. Wachstums- bzw. Lysekurven wurden durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm erstellt. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl bei unterschiedlichen optischen Dichten erfolgte durch Ausplattierung definierter Verdünnungen.

1.2. Transformation von *E. coli* und Konservierung kompetenter Zellen

Die Präparation kompetenter Zellen und Transformation wurde nach der modifizierten Methode von Dagert und Ehrlich (Dagert und Ehrlich 1979) durchgeführt. Eine Einzelkolonie des zu transformierenden Stammes wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen. 100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml der jew. Uebernachtkultur beimpft und unter Belüftung bei 30 oder 37 C bis zur OD 600 von 0,8-1,0 inkubiert. Nach Abzentrifugation der Zellen, Resuspension in 15 ml sterilem 50 mM Calciumchlorid und 15 minütiger Verweildauer in Eis, wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 1,5 ml 50 mM Calciumchlorid resuspendiert. Die Zellsuspension wurde entweder eine Stunde oder über Nacht in Eis belassen.

Zur Konservierung kompetenter Zellen wurden diese mit sterilem 50% Glycerin (Verhältnis: 2:1) versetzt und bei -70 C eingefroren (Morrison 1977). Zur Transformation wurden 0,1 ml kompetente Zellen mit verschiedenen Mengen Plasmid-DNA vermischt, zunächst 10-15 Minuten auf Eis belassen, dann 3 Minuten bei 42 C inkubiert, wieder 1 Minute auf Eis gestellt und anschließend 1 h nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium bei 28 C oder 37 C inkubiert. Nach Ausspateln auf den entsprechenden Indikatorplatten wurden pro pmol eingesetztes Plasmid ungefähr 10^5 bis 10^6 Transformanten erhalten.

1.3. Vermehrung von PhiX174 und PhiX174am3

Zur Phagenvermehrung wurde von Einzelplaques ausgegangen. Diese wurden aus den Agarplatten ausgestochen und in 1 ml 50 mM

Dinatriumtetraborat aufgenommen. Mit der eluierten Phagensuspension erfolgte die Infektion von exponentiell wachsenden Wirtsbakterien. Nach Lyse der Wirtsbakterien und Abzentrifugation der Zelltrümmer wurde der Phagentiter durch Vermischen einer definierten Verdünnung von Phagen (0,1 ml) mit exponentiell wachsenden Indikatorbakterien (0,2 ml) bestimmt, indem dieses Gemisch zusammen mit LB-Weichagar in Petrischalen ausgegossen und die Plaques 4-6 h nach Bebrütung bei 37 C ausgezählt wurden.

Zur Großpräparation von PhiX174 wurde E. coli PC1363 in 8 Liter CY-Medium unter starker Belüftung inkubiert und bei OD 600 von 0,8 mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart von 2 mM Calciumchlorid infiziert.

Zur Präparation von PhiX174am3 wurde E. coli PC1363 in 500 ml CY-Medium angezogen. Die Infektion mit PhiX174am3 Phagen erfolgte ebenfalls bei OD 600 von 0,8 mit einer MOI von 3 in Gegenwart von 2 mM Calciumchlorid.

In beiden Fällen wurden die Zellen ungefähr 3 h nach Infektion durch Zentrifugation bei 10 KUpm und 2 C (Ja10) geerntet.

Zur Freisetzung der PhiX174am3 Phagen, bei denen die am3 Mutation zu einer Akkumulation der Nachkommenphagen in E. coli PC1363 führt, wurde das Zellsediment in 20 ml 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 10 mg/ml Lysozym, pH 8,0 resuspendiert. Anschließend wurde 30 min in Eis und dann 10 min bei 37 C inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 5 maliges Einfrieren und Auftauen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer (Ja20, 40 min, 20 KUpm, 2 C) wurden die Phagen durch Ultrazentrifugation (SW27, 4 Stunden, 27 KUpm, 2 C) sedimentiert und in 1 ml 50 mM Dinatriumtetraborat resuspendiert.

Das Zellsediment von E. coli PC1363, das die PhiX174 Phagen enthielt, wurde zunächst in 200 ml 50 mM Dinatriumtetraborat resuspendiert und über Nacht bei 4 C auf einem Rollbrett gedreht. Zur Freisetzung der PhiX174 Phagen wurde die Suspension mit 10 ml Lysozylösung (2 mg/ml dest. Wasser) und 3 Minuten später mit 5 ml 0,1 M EDTA, pH 8,0 versetzt und anschließend 30 Minuten bei 37 C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden in drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten entfernt (a: Ja10, 20 min, 10 KUpm; b: Ja20, 20 min, 12 KUpm; c: SW27, 30 min, 8 KUpm). Die Sedimentation der Phagen erfolgte wiederum durch Ultrazentrifugation des Ueberstandes (SW27, 4 Stunden,

27 KUpm, 2 C). Das Phagenpellet wurde anschließend in 2 ml Dinatriumtetraborat aufgenommen. Der Phagentiter beider Präparationen lag ungefähr bei 10^{12} - 10^{13} pro ml.

Die weitere Reinigung der Phagen erfolgte durch isopyknische Zentrifugation im Cäsiumchloridgradienten. Pro Gramm Phagensuspension wurden 0,625 g Cäsiumchlorid zugegeben und 36 h bei 45 KUpm und 18 C (60Ti) zentrifugiert. Die Phagenbande wurde mit einer Spritze entnommen und gegen 50 mM Dinatriumtetraborat dialysiert. Alle aufgeführten Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Beckmann Kühl- bzw. Ultrazentrifuge.

2. Präparation von DNA

2.1. Minilysate

Zur Isolation von Plasmid DNA wurde die von Maniatis (Maniatis et al. 1982) beschriebene Methode angewandt, die ihrerseits eine Modifikation der Prozedur von Birnboim und Doly darstellt (Birnboim und Doly 1979).

3 ml Bakterienkultur wurden bei RT abzentrifugiert, in 0,1 ml Lysozymlösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, 4 mg/ml Lysozym, pH 8,0) aufgenommen, 5 min bei RT belassen und nach Zugabe von 0,2 ml SDS/NaOH-Lösung (0,2 N NaOH; 1% SDS) sanft geschüttelt. Nach 5 min auf Eis wurden 0,15 ml 3 M Kaliumacetat zugegeben und gut durchmischt. Dadurch wurden Proteine, hochmolekulare RNA, sowie chromosomale DNA gefällt. Nach 5 minütiger Verweildauer auf Eis wurde in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert und der Ueberstand mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch (1:1) extrahiert. Der Ueberstand wurde mit doppeltem Volumen Ethanol (96%) versetzt und nach 2 Minuten abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge: 5 min). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, im Exikator getrocknet und in 0,03 ml TE resuspendiert.

2.2. Reinigung von DNA über Cäsiumchloridgradienten

Plasmide mit Col E1 Replikon wurden in E. coli durch Chloramphenicolzugabe (Endkonzentration: 0,2 mg/ml) bei OD 600 von 1,0 über 12-15 Stunden amplifiziert (Clewell 1972). Die Plasmid DNA Isolation im 500 ml bis 1 Liter Maßstab erfolgte nach der gleichen Methode, wie sie für die Minilysate beschrieben wurde. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das getrocknete Pellet in 20 ml (Präp. von 500 ml Kultur) oder

40 ml TE (Präp. von 1 Liter Kultur) aufgenommen, pro ml 1g festes Cäsiumchlorid und 0,05 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und die Zentrifugenröhrchen mit Paraffin aufgefüllt. Nach 40 stündiger Zentrifugation (60Ti, 40 KUpm, 18 C) wurde die Plasmidbande (2. Bande von oben unterhalb der chromosomalen DNA) unter UV-Licht mit einer Spritze entnommen. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde 3-4 x mit Isopropanol (gesättigt mit 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 M Natriumchlorid, pH 8,0) extrahiert und anschließend gegen TE-Puffer dialysiert. Nach Dialyse wurde zur Denaturierung von Restprotein Phenol/Chloroform (1:1) in äquivalenter Menge zugegeben, 2 x extrahiert und dann in Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat und 2,5 mM Magnesiumacetat mit 2,5 Volumen Ethanol (96%) 30 min bei -70 C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 13 KUpm pelletiert, im Exikator getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.3. Präparation von PhiX174 RF-DNA

E. coli PC1363 wurde in 1 Liter LB-Medium angezogen und bei OD 600 von 0,8 mit einer MOI von 5 mit PhiX174 infiziert. Zur Hemmung der Proteinsynthese wurde nach 10 min Chloramphenicol (Endkonzentration: 0,035 mg/ml) zugesetzt und die Kultur auf 30 C abgekühlt. Nach 45 min bei 30 C wurden die Zellen abzentrifugiert (Ja10, 20 min, 10 KUpm, 4 C) und in 50 ml 5 mM Tris, 50 mM Natriumchlorid, pH 7,5 aufgenommen. Durch Zugabe von 30 mg Lysozym, 0,5 ml Triton X-100, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) und 30 minütiger Inkubation bei 37 C wurden die Zellen lysiert. Nicht aufgeschlossene Zellen, Membranfragmente und assoziierte chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (Ja20, 30 min, 20 KUpm, 2 C) entfernt und festes Natriumchlorid sowie Polyethylenglycol (Endkonzentrationen: 0,5 M bzw. 10%) zugegeben. Nach 15 min bei 0 C wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (SW27, 40 min, 13 KUpm, 4 C) und das Pellet in 40 ml 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0 gelöst. Nach Zugabe von 1g festem Cäsiumchlorid pro ml Lösung und 0,05 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die DNA über Cäsiumchloridgradienten gereinigt.

2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Nach Reinigung von Plasmid- oder Phagen DNA lag das 260/280 Verhältnis im Bereich zwischen 1,8-2,0. Die Konzentration so präparierter DNA (enthält wenig Protein) konnte mit Hilfe der

Formel $OD\ 260/20 = \text{mg DNA/ml}$ bestimmt werden. Die ungefähre Bestimmung der Plasmid DNA Konzentration aus Minilysaten oder von isolierten DNA Fragmenten erfolgte durch Abschätzung der Bandenintensitäten im Agarosegel mit DNA Standards.

3. Enzymreaktionen mit DNA

3.1. Verdau durch Restriktionsenzyme

Die Mehrzahl der verwendeten Enzyme konnten in drei Standardpuffern inkubiert werden. Alle 3 Puffer enthielten 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM DTE als gemeinsame Komponenten, während im "Low-buffer" kein Natriumchlorid und 10 mM Tris, im "Medium-buffer" 50 mM Natriumchlorid und 10 mM Tris und im "High-buffer" 100 mM Natriumchlorid und 50 mM Tris enthalten war. Der pH Wert der Puffer wurde auf 7,5 eingestellt. Lag die Aktivität der verwendeten Enzyme in diesen Standardpuffern unter 75% (nach Angaben der Hersteller), wurden die von den Herstellern angegebenen Inkubationspuffer verwendet. Diese waren, ebenso wie die Standardpuffer 10 fach konzentriert und wurden bei -20 C aufbewahrt.

Die benötigten Enzymeinheiten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{MG(\lambda)}{MG(a)} \times \frac{n(a)}{n(\lambda)} = \text{Units}/\mu g(a)$$

(a) = zu schneidende DNA; n = Anzahl der Schnittstellen/DNA-Molekül;

Mit den so errechneten Enzymkonzentrationen wurde die DNA 1-2 h verdaut. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde der Restriktionsansatz 10 min auf 70 C erhitzt oder mit Phenol/Chloroform behandelt.

3.2. Auffüllen von Einzelstrang DNA Enden

Viele Restriktionsenzyme spalten DNA unter Bildung von 5' überstehenden Enden. Solche Enden können durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in Gegenwart der benötigten Desoxynukleotidtriphosphate aufgefüllt werden. Die Auffüllreaktion von linearisierten Plasmiden und DNA Fragmenten wurde in Gegenwart von 20 mM Tris, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM DTE, pH 7,6 und 0,5 mM von jedem der vier dNTP's für 45 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch Erhitzen auf 70 C für 10 min wurde das Enzym inaktiviert.

3.3. Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten erfolgte in kleinen Reaktionsvolumina (0,02-0,03 ml) in 20 mM Tris, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM DTE, 1 mM ATP, pH 7,6. Zur Ligierung überstehender Enden wurden ca 0,03 Einheiten T4 DNA-Ligase pro μ l Reaktionsvolumen eingesetzt. Für glatte Enden wurde 5 x soviel Ligase verwendet. Die Reaktionsansätze wurden zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur belassen und dann über Nacht bei 12 C inkubiert. DNA Fragmente wurden gegenüber dem Vektor im molaren Überschuß von 5:1 bis 10:1 eingesetzt.

3.4. Nick Translation

Gereinigte DNA Fragmente wurden in folgendem Ansatz 3 Stunden bei 14 C inkubiert: 1,0 μ g DNA, 50 mM Tris (pH 7,5), 10 mM Magnesiumsulfat, 1 mM DTT, 0,05 mg/ml BSA, 20 μ M dCTP/dTTP/dGTP, 10 μ Ci (α -³²P)-dATP (ca 3000 Ci/mmol), DNA-Polymerase I (4 U) in 0,05 ml Reaktionsvolumen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l t-RNA (10 μ g/ml), 5 μ l 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (96%) gestoppt, die nichtinkorporierten Nukleotide durch Zentrifugation (30 min Minifuge) abgetrennt, das Fragment bei 60 C getrocknet, in 0,1 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen und anschließend die inkorporierte Radioaktivität im Fragment bestimmt.

4. Isolierung und Reinigung von DNA Fragmenten

4.1. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach Auftrennung im Agarosegel wurde das Agarosestück, das dem gesuchten Fragment entsprach, mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und in einen kleinen Dialyseschlauch eingebracht. Dieser war mit wenig TEE-Puffer gefüllt, so daß das Fragment durch Anlegung einer Spannung aus dem Agaroseblock heraus eluiert werden konnte. Vor Beendigung der Elektroelution wurde die Spannung für 1 min umgepolt, damit an der Dialysemembran haftende DNA-Fragmente abgelöst wurden. Der DNA haltige TEE-Puffer wurde anschließend phenolisiert, die DNA gefällt, getrocknet und in bidest. Wasser resuspendiert.

4.2. Isolierung von DNA aus PAA-Gelen

Kleine DNA Fragmente wurden in einem PAA-Gel aufgetrennt, das dem Fragment entsprechende Gelstück mit einer Rasierklinge

ausgeschnitten und fein zermahlen. Zur Elution wurden die PAA Stücke über Nacht bei 37 C in 0.3 M Natriumchlorid, 3 mM EDTA, 30 mM Tris, pH 7,6 inkubiert. Nach Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge: 5 min) wurde die Lösung durch eine Eppendorffspitze, die mit Glaswolle gestopft war, filtriert. Die DNA wurde durch Zugabe von 5ul t-RNA (4 mg/ml) in 2,5 Volumen Ethanol (96%) gefällt, getrocknet und in bidest. Wasser aufgenommen.

4.3. Chromatographie an BND Cellulose

Zur Reinigung und Konzentrierung von DNA wurde BND Cellulose (Henrich et al. 1982b) verwendet. Pro ug eingesetzter DNA wurden 6 ul gepackte BND Cellulose benutzt. Die BND Cellulose war zuvor mit TEE, 50% Formamid, 1 M Natriumchlorid gewaschen und in TEE-Puffer äquilibriert worden. Nach Packung der Säulen (mit Glaswolle gestopfte Eppendorffspitzen) und Auftragen der DNA Lösung wurde mit 0,3 M Natriumchlorid in TEE-Puffer gewaschen (mit 15 fachem Säulenvolumen). Anschließend wurde mit 20% Ethanol und 1 M Natriumchlorid in TEE-Puffer eluiert. Es wurden 6 Fraktionen zu je 50 ul gesammelt, der DNA Gehalt durch Agarosegelelektrophorese ermittelt und die DNA haltigen Fraktionen vereint und gefällt.

5. Sequenzanalyse der DNA nach Maxam und Gilbert

Das Prinzip der DNA Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert 1980) liegt in der basenspezifischen Spaltung der DNA und in der nachfolgenden Lagebestimmung der jeweiligen Spaltung relativ zu einem markierten Ende des DNA Moleküls.

Zur Sequenzierung des Gen lac Z-E' Uebergangs wurde Plasmid pSB10 (Abb.38) mit EcoRI verdaut und mit Hilfe des Klenow Fragmentes durch alpha-32-P-Desoxyadenosintriphosphat an den überstehenden Enden markiert. Da auf diese Weise beide Enden des Fragmentes radioaktiv markiert waren, wurde mit PstI nachgespalten und die Fragmente in einem 6% PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Fragmente autoradiographisch sichtbar gemacht und das zu sequenzierende DNA Fragment isoliert. Dies war nur an einem Ende markiert, so daß es nach der basenspezifischen Spaltung und Auftrennung im Sequenzgel nicht zu Ueberlagerungen der von beiden markierten Enden resultierenden Fragmenten kommen konnte (Rüther et al. 1981; Rüther 1982). Nach Elution, Fällung, Waschen (70%

Ethanol) und Trocknen wurde das Fragment in 20 µl bidest. Wasser aufgenommen und zur basenspezifischen Spaltung in 4 Aliquots a 5 µl geteilt. Die nachfolgenden Schritte der 4 basenspezifischen chemischen Spaltungen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tab.2: Chemische Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

G	A
200µl DMS-Puffer	100µl 1,2M NaOH/1mM EDTA
1µl Carrier-DNA	1µl Carrier-DNA
5µl alpha-32-P-DNA	5µl alpha-32-P-DNA
auf Eis bei 0 C	auf Eis bei 0 C
1µl DMS	
mischen auf Vortex	mischen auf Vortex
3 min RT	12 min 90 C
in Eis	in Eis
50µl DMS-Stop	
mischen auf Vortex	
750µl kaltes Ethanol (96%)	
10 min -70 C	5µl t-RNA (1mg/ml)
10 min zentrifugieren	150µl 1M Essigsäure
Pellet + 250µl Natrium- acetat pH 6,0	
C/T	C
20µl steril. Wasser	20µl 4M Natriumchlorid
1µl Carrier-DNA	1µl Carrier-DNA
5µl alpha-32-P-DNA	5µl alpha-32-P-DNA
auf Eis bei 0 C	auf Eis bei 0 C
30µl Hydrazin	30µl Hydrazin
mischen auf Vortex	mischen auf Vortex
10 min 37 C	15 min 37 C
in Eis	in Eis
200µl Hydrazin-Stop	200µl Hydrazin-Stop
mischen auf Vortex	mischen auf Vortex
750µl kaltes Ethanol (96%)	750µl kaltes Ethanol (96%)
10 min -70 C	10 min -70 C
10 min zentrifugieren	10 min zentrifugieren
Pellet + 250µl 0,3M Natrium- acetat pH 6,0	Pellet + 250µl 0,3M Natrium- acetat pH 6,0

Die folgenden Schritte sind für alle 4 Reaktionen identisch:

750µl kaltes Ethanol (96%)
 10 min -70 C
 10 min zentrifugieren
 Pellet + 1ml Ethanol (70%)
 5 min zentrifugieren
 Pellets im Exikator trocknen (5 min)
 100µl 1M Piperidinlösung
 Vortex, kurz zentrifugieren
 30 min 90 C
 umfüllen in ein neues Eppendorfgefäß
 10µl 3M Natriumacetat, pH 7,0
 5µl t-RNA (4mg/ml)
 400µl Ethanol (96%)

10 min -70 C
10 min zentrifugieren
Pellet + 1ml Ethanol (70%)
5 min zentrifugieren
Pellet trocknen
3ul Formamid/EDTA Farbmarker
2 min 90 C
in Eis; auf Sequenzgel auftragen

6. Gelelektrophoresen

6.1. Elektrophorese von DNA

6.1.1. Agarosegele

Zur Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten wurde vorwiegend Agarose in Konzentrationen zwischen 0,7 und 2% benutzt, die in TEE-Puffer aufgekocht und auf Glasplatten oder in horizontale Elektrophoresekammern unterschiedlicher Länge gegossen wurde. Taschen zum Auftragen der Proben wurden durch Eintauchen von Plexiglasrinnen in die noch heiße Agaroselösung gebildet. Nach Ueberschichten der abgekühlten Agarose und Entfernung des Kammes wurden die DNA-Proben mit 1/4 Volumen 5 fach konzentriertem DNA-Probepuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug bei 120 V und RT 1-3 h.

6.1.2. PAA-Gele

Zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (kleiner 400bp) wurden zur besseren Trennung und zur Bandenschärfung PAA-Gele verwendet, die sich aus 6% Acrylamid, 0,16% Bis, 0,05% Temed, 1% APS in 1/2 x TBE-Puffer zusammensetzten. Die Gele wurden zwischen 2 Glasplatten (15 x 17 cm; Stärke des Gels: 1 mm) gegossen und die Proben in vertikalen Elektrophoresekammern bei RT und 200 V für 1 h in 1/2 x TBE-Puffer elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese wurden sowohl die Agarose-, als auch die PAA-Gele 10-20 min in eine Ethidiumbromidlösung (5 ug/ml Wasser) gelegt und die DNA Banden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht. Als Molekulargewichtsstandards für Agarose- und PAA-Gele wurde folgende DNA, die mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut wurde, verwendet:

PhiX174: TaqI; PhiX174: HindII; PhiX174: HaeIII; Lambda:
EcoRI; Lambda: HindIII; P22: EcoRI; L: EcoR5; pUR222: HaeIII;
pUR222: HinfI; pUR222: AluI; pBR322: HinfI;

6.1.3. Sequenzgele

Die Sequenzgele wurden zwischen 20 cm breiten und 40 cm langen Glasplatten gegossen, wobei eine der Platten einen Wasserkreislauf besaß. Als "Spacer" wurden 0,2 mm dicke Teflonstreifen verwendet. Zur besseren Ablösung der dünnen Gele wurde die 'Thermoplatte' mit Dimethyldichlorsilan und die 'Ohrenplatte' mit Silan GF31 (15 µl in 150 µl 10% Essigsäure und 5 ml Ethanol) eingerieben und dann mit Ethanol gespült. Zur Auftrennung der markierten Fragmente wurde ein Gel aus 12% Acrylamid, 0,32% Bis, 8 M Harnstoff, 0,07% APS und 0,02% Temed in 1/2 x TBE-Puffer hergestellt. Nach Vorlauf (30 min; 1000 V) wurden die Proben aufgetragen und bei 2000 V und 20 mA in 1/2 x TBE-Puffer 1,5 h bei 60 C elektrophoretisiert. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das Gel nach Beendigung des Laufs für 20 min in 10% Essigsäure und 5% Glycerin gelegt. Das Gel wurde dann bei 80 C auf der Platte getrocknet und die Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

6.2. Elektrophorese von Proteinen

Die SDS-PAGE von Proteinen wurde in einer vertikalen Flachgelapparatur (Studier 1973) nach Lämmli (Lämmli 1970) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 7,5%, 14-20% und 15-23,5% Gele benutzt. Die Gradientengele wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt, indem die aus 2 Glasplatten bestehende Kassette (18 cm breit; 20 cm lang; 1 mm stark) zuvor an den Seiten und am Boden mit 2% Agarose abgedichtet und von oben gefüllt wurde. Zur Herstellung der Gradiententrenngele wurden folgende Ausgangslösungen verdünnt:

Lösungen:	14%	15%	20%	23,5%
Acrylamid:Bis	9,3	10	13,3	15,5
4x Trenngelpuffer:	5	5	5	-
7,2x Trenngelpuffer:	-	-	-	2,77
Glycerin (50%):	0,33	0,33	1,33	1,33
dest. Wasser:	5	4,3	-	0,03
SDS (10%):	0,2	0,2	0,2	0,2
Temed:	1,7µl	1,7µl	0,6µl	0,6µl
APS (10%):	0,15	0,15	0,15	0,15

Alle Mengenangaben beziehen sich auf die oben beschriebene Kassettengröße und sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, in ml angegeben.

Nach dem Gießen wurde das Trenngel vorsichtig mit dest. Wasser überschichtet und zum Polymerisieren etwa 1 h bei RT belassen. Die 2. Stufe der Gele bestand aus einem Sammelgel, das aus 1,9 ml Acrylamid:Bis, 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer, 7,5 µl Temed, 0,1 ml SDS (10%), 80 µl APS (10%) und 5,8 ml Wasser hergestellt wurde. Nach Auftragen der Proben in Protein-Probepuffer wurden die Proteine zunächst zur Bandenschärfung bei 80 V und anschließend bei 160 V (14–20% Gel) oder 190 V (15–23,5% Gel) für 12 h bei RT in Lämmli-Reservoirpuffer elektrophoretisiert.

Das verwendete 7,5% PAA-Gel hatte folgende Zusammensetzung: 7,5 ml Acrylamid:Bis, 7,5 ml 4 x Trenngelpuffer, 15 µl Temed, 0,3 ml APS (10%), 14,7 ml dest. Wasser (Kassette: 17 cm lang; 15 cm breit; 1 mm stark)

Ein Sammelgel wurde nicht verwendet. Die Elektrophoresedauer betrug 2,5 h in Lämmli-Reservoirpuffer bei 180 V und RT.

6.2.1. Autoradiographie und Fluorographie

Zur Verstärkung der Bandenintensitäten von 3-H und 35-S markierten Proteinen wurden die Gele zur Dehydratisierung 1 h in DMSO gelegt, 3 h mit 20% PPO in DMSO behandelt, sowie danach 1 h gewässert (Bonner und Laskey 1974) und anschließend unter Vakuum getrocknet. Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine und DNA wurde von den Gelen ein Autoradiogramm mit Kodak RP-X Omat Röntgenfilm hergestellt.

6.2.2. Anfärbung der Proteinbanden

6.2.2.1. Coomassie Färbung

Die Gele wurden bei 37 C 1 h in einer filtrierten Lösung von 0,3% Coomassie-blau, 45% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt. Der Entfärbeprozess wurde unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure) bei 37 C durchgeführt.

6.2.2.2. Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde ein käuflich erworbener 'Färbe-Kit' der Firma Bio-Rad verwendet. Die Färbung basiert im wesentlichen auf einer Methode von Merrill (Merrill et al. 1981).

Die Gele wurden zunächst 1 h in 40% Methanol und 10% Essigsäure fixiert und anschließend 2 x für 30 min in 10% Ethanol und 5% Essigsäure gelegt. Danach erfolgte eine 10 minütige Behandlung mit 0,1% Kaliumdichromat und 0,02% Salpetersäure. Vor und nach der 30 minütigen Behandlung mit Silberreagenz (0,2% Silbernitrat) wurde 3 x 10 min mit Wasser gewaschen. Dann wurde 3 x in zuerst 1 minütigem, dann 2 x fünf minütigem Intervall Entwickler (3,9% Kupfersulfat, 3,9% Natriumchlorid, 45,8% Natriumthiosulfat in 25% Ammoniaklösung) zugegeben. Nachdem die Proteine sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5% Essigsäure abgestoppt.

7. Proteinbestimmungen

7.1. Ninhydrinmethode

3 g Ninhydrin und 1 g Hydrindantin wurden in 375 ml Ethylenglykolmonomethylether gelöst, wobei ständig Stickstoff durch die Lösung geleitet wurde. Nach Zugabe von 125 ml 4 M Natriumacetatpuffer (pH 5,5) wurde die Lösung unter Stickstoff bei 4 C aufbewahrt (Moore und Stein 1954).

Zur Anfertigung einer Standardkurve wurden 5, 10, 20, 40 und 80 µg BSA in einem Reagenzglas für 2,5 Stunden in 1 ml 2,5 N Natriumhydroxid bei 90 C hydrolysiert. Danach wurde 1 ml 30% Essigsäure zugegeben. Nach Zugabe von 1 ml Ninhydrinreagenz wurden die Proben kräftig geschüttelt und 15 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Die Erstellung der Eichkurve erfolgte durch Extinktionsmessung bei 578 nm.

7.2. Absorptionsmessung bei 230 und 260 nm

Es handelt sich um eine direkte spektrometrische Methode (Kalb et al. 1977). Nach Messung der Absorption bei 230 und 260 nm kann die Proteinkonzentration einer Probe errechnet werden:

Proteinkonzentration (µg/ml) = $183 \times A(230) - 75,8 \times A(260)$

8. Präparation von Minizellen

Die Isolation und Reinigung von Minizellen erfolgte nach der Methode von Reeve (Reeve 1979). Zur Isolierung von plasmidtragenden Minizellen wurde ein 1000 ml Erlenmeyerkolben, der 250 ml LB-Medium mit 0,1% Glucose und die entsprechenden Antibiotika enthielt, verwendet. Dieser wurde mit 50 µl Uebernachtkultur, die von einer Einzelkolonie gewonnen wurde,

angeimpft und 12 Stunden sehr langsam geschüttelt. Vor der Zellernte (Ja10, 10 min, 8 KU_{pm}, 4 C) wurde die Belüftung der Kultur durch Erhöhung der Schüttelfrequenz für eine Stunde verstärkt. Nach schonender Resuspension mit einer Glaspipette wurde das Zellpellet jeweils in 10 ml 1 x M9-Salz aufgenommen. 5 ml der jeweiligen Zellsuspension wurde auf einen linearen Sacharosegradienten (10-30%) gegeben. Die Zentrifugation der Gradienten erfolgte im SW27 Rotor für 20 min bei 5 KU_{pm} und 4 C in einer Beckmann Ultrazentrifuge. Nach der Zentrifugation bildeten die Parentalzellen das Pellet, während die Minizellen als diffuse Bande ungefähr in der Mitte des Zentrifugenröhrchens sichtbar waren. Die Minizellbande wurde mittels einer Spritze abgezogen und in ein steriles Reagenzglas überführt. Nach Abzentrifugation der Minizellen (Ja20, 10 min, 12 KU_{pm}, 4 C) wurden diese wieder in 1 x M9-Salz resuspendiert und einer weiteren Gradientenzentrifugation unterworfen. Die Reinigung über Sacharosegradienten wurde pro Ansatz 3 x durchgeführt. Nach dem 3. Gradienten wurde das jeweilige Minizellpellet einmal mit M9-Salz gewaschen, in 1 ml M9-Medium aufgenommen und D-Cycloserin (Endkonzentration: 4 mM) zur Wachstumsinhibition der noch vorhandenen Parentalzellen zugegeben.

9. Markierung plasmidcodierter Proteine in Minizellen

Zur Markierung wurden ausschließlich frisch präparierte Minizellen verwendet.

Markierung mit 35-S-Methionin:

Zu 0,5 ml Minizellen in M9-Medium, das 4 mM D-Cycloserin enthielt, wurden 0,1 ml Methionin-Assay-Medium und 10 uCi 35-S-Methionin (1023 Ci/mmol) in 50 ul Methionin-Assay-Medium zugegeben und 45 min bei 42 C (zur Inaktivierung des cI857 Repressors) inkubiert.

Markierung mit einem 3-H Aminosäuremix:

Zu 0,5 ml Minizellen in M9-Medium, das 4 mM D-Cycloserin enthielt, wurden 15 uCi der folgenden 3-H markierten Aminosäuren zugesetzt: Leucin (120 Ci/mmol), Lysin (80 Ci/mmol), Phenylalanin (120 Ci/mmol), Prolin (130 Ci/mmol), Tyrosin (90 Ci/mmol) und 45 min bei 28 C oder 42 C inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Minizellen abzentrifugiert und das Pellet in 50 ul Protein-Probepuffer aufgenommen. Für die SDS-PAGE wurden die Proben 3 Minuten bei 100 C gekocht.

Zur Isolation der Membranfraktion 3-H markierter Minizellen wurde die 5 fache Menge des oben angegebenen Ansatzes verwendet. Zur Messung der inkorporierten Radioaktivität wurden jeweils 5 μ l Probe zu 50 μ l BSA-Lösung (5 mg/ml) gegeben, die Lösung mit 3 ml 5% TCA versetzt und das TCA präzipitierbare Material auf Membranfiltern (Whatman GF/C) gesammelt. Dann folgte 3 maliges Waschen mit je 3 ml 5% TCA. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol (60%) wurden die Filter im Exikator getrocknet, in 5 ml Szintillationscocktail eingeweicht und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

10. Aufschluß von E.coli Zellen

10.1. Aufschluß durch Ultraschall

Der Aufschluß durch Ultraschall diente einerseits der Bestimmung von intrazellulären Enzymaktivitäten, andererseits zur Präparation der Membranfraktion von E. coli. Die Kulturen wurden im Eisbad 6-10 x 30 Sekunden beschallt (Braun Sonic 300, Sondendurchmesser: 9,5 mm). Jeder Beschallung folgte eine Kühlperiode von 1 Minute. Die Abtrennung von intakten Zellen und Zelltrümmern wurde entweder in der Kühlzentrifuge (Ja20, 10 min, 8 KUpm, 4 C) oder in der Eppendorffzentrifuge (5 min, 4 C) durchgeführt. Der Ueberstand wurde zur Messung der Enzymaktivitäten oder zur Präparation der Membranfraktion verwendet.

10.2. Aufschluß durch Lysozym/EDTA

Zum quantitativen Aufschluß wurden die Zellen durch Lysozym/EDTA Behandlung lysiert (Ron und Kohler 1966; Looman et al. 1985). Zunächst wurde das Pellet 1 x mit 25 mM Tris (pH 8,1) gewaschen, im gleichen Puffer resuspendiert, 1/100 Volumen Lysozymlösung (2 mg/ml in 0,25 M Tris, pH 8,1) zugesetzt und 20 min in Eis gestellt. Dann wurde 1/100 Volumen EDTA (8 mg/ml in 0,1 M Tris, pH 8,1) zugegeben und wieder 20 min in Eis gekühlt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch 3 x einfrieren und auftauen in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde DNA'se zugesetzt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert.

11. Isolierung der Membranfraktion von E. coli

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, 1 x mit Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen, durch Beschallung im

gleichen Puffer aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Zur Isolation der Membranfraktion wurde der Ueberstand einer weiteren Zentrifugation unterworfen (Ja20, 45 min, 20 KUpm, 4 C). Der Ueberstand wurde verworfen und das Pellet, welches der Membranfraktion entsprach (Boyd und Holland 1979), 2 x mit Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen.

12. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die β -Galaktosidaseaktivität wurde nach der Methode von Miller (Miller 1972) bestimmt. Zu 0.1 ml der jeweiligen Proben, die innerhalb einer Meßreihe immer von Kulturen gleicher optischer Dichte präpariert worden waren, wurde 0,4 ml Z-Puffer und 0,1 ml ONPG (4 mg/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0) zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 28 C bis zur deutlich sichtbaren Gelbfärbung inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 0,25 ml 1 M Natriumcarbonat abgestoppt. Die Messung der Farbtintensität erfolgte photometrisch bei 420 nm. Die β -Galaktosidaseaktivitäten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$OD\ 420 / t \times ml \times 1000 = \text{units} / ml$$

(t = Inkubationszeit in Minuten bei 28 C)

Da alle Proben in der gleichen Zelldichte eingesetzt wurden und keine Zellfragmente anwesend waren, entfallen die von Miller angegebenen Korrekturfaktoren in der verwendeten Formel.

Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität im Kulturüberstand erfolgte nach der Formel:

$$OD\ 420 / ml \times min = \text{units} / ml \times min$$

13. Reinigung des lacZ-E' Genproduktes

Die Herstellung der Affinitätssäule und die Reinigung des β -Gal-E'-Fusionsproteins wurde nach einer modifizierten Methode von Ullmann (Ullmann 1984) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Reinigungsmethoden (Fowler und Zabin 1983) liegt in der Zeitersparnis, in der Reinheit und hohen Ausbeute der gereinigten Fusionsproteine.

13.1. Kopplung von TPEG an CH Sepharose 4b

Das β -Galaktosidaseanalogon TPEG (Steers et al. 1971) wurde an CH Sepharose 4b, die einen "Spacer" mit 6 Kohlenstoffatomen bis zur reaktiven Carboxylgruppe besitzt, über EDC gekoppelt. Dadurch

wird die gute Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des β -Galaktosidaseanteils im Fusionsprotein für das Analogon ermöglicht.

2 g CH Sepharose 4b wurden mit 0,5 M Natriumchlorid (200 ml/g) gequollen (15 min) und auf einem Glasfilter mit 0,5 M Natriumchlorid gewaschen. Anschließend wurde die gequollene Sepharose mit dest. Wasser (pH 4,5) gewaschen (50 ml/g) und in 8 ml dest. Wasser (pH 4,5) aufgenommen. Zu 8 ml Gel (entspricht 112 μ mol Spacergruppen) wurden 22,9 mg TPEG (entspricht einem 100 fachen molaren Ueberschuß gegenüber den reaktiven Carboxylgruppen der Spacergruppen) in 16 ml dest. Wasser (pH 4,5) und zur Kopplung der beiden Komponenten 0,46 g EDC (Endkonzentration: 0,1 M) zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zur Entfernung überschüssiger Edukte und dem entstehenden Reaktionsprodukt Isoharnstoff wurde mit 3 l dest Wasser auf einem Glasfilter gewaschen. Die TPEG substituierte Sepharose wurde in 8 ml Äquilibrierungspuffer (20 mM Tris, 10 mM Magnesiumchlorid, 1,6 M Natriumchlorid, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,4) resuspendiert, 3 ml in eine Bio-Rad Econo-Säule (Länge: 10 cm; Durchmesser: 0,7 cm) gegeben und mit 30 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen.

13.2. Affinitätschromatographische Reinigung des β -Gal-E'-Fusionsproteins

Zur Reinigung des Fusionsproteins wurden zwei 1 l Kolben, die jeweils 250 ml LB-Medium enthielten, mit 2 ml Vorkultur von *E. coli* PC1331(pSB10) angeimpft und über Nacht in Gegenwart von Amp und IPTG (Endkonzentration: 1 mM) zur Expression des lacZ-E' Hybridgens inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und 2 x mit 20 mM Tris (pH 7,4) gewaschen. Der Aufschluß erfolgte durch Lysozym/EDTA. Dann wurde der Ueberstand (10 ml Rohextrakt) mit Stocklösungen von 1 M Magnesiumchlorid, 1 M β -Mercaptoethanol, festem Natriumchlorid und 20 mM Tris (pH 7,4) bis zu den für den Äquilibrierungspuffer angegebenen Endkonzentrationen versetzt (Gesamtvolumen: 15 ml) und auf die Affinitätssäule aufgetragen. Der Säulenlauf wurde bei RT durchgeführt und die Flußrate auf 0,1 ml/min eingestellt. Anschließend wurde mit Äquilibrierungspuffer solange gewaschen bis im Durchlauf keine

Absorption bei 280 nm mehr meßbar war. Das Fusionsprotein konnte anschließend mit 0,1 M Dinatriumtetraborat, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 10, eluiert werden. Es wurden 12 Fraktionen a 0,5 ml gesammelt und deren β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die β -Galaktosidase positiven Fraktionen wurden vereinigt, gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

14. Immunogenpräparation und Immunisierung

14.1. Peptid Kopplung mit Carbodiimid und Glutaraldehyd an Thyroglobulin

Die Kopplung von Peptid C (Tyr-Lys-Asn-Phe-Val-Arg-Lys-Glu) mit EDC (Goodfriend et al. 1964) und GA (Reichlin 1980) und Peptid A (Tyr-Lys-Lys-Thr-Cys-Val-Lys) mit GA an Thyroglobulin erfolgte in einem 2-Stufenprozeß (Nakane und Kawaoi 1974).

10 mg Thyroglobulin und 200 mg EDC wurden in 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) gelöst, zunächst 2 h bei RT und dann 20 h bei 4 C sanft geschüttelt. Ebenso wurde 40 mg Thyroglobulin in 0,8 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) gelöst, mit 0,1 ml GA (25%) versetzt, 2 h bei RT und anschließend 20 h bei 4 C unter Schütteln inkubiert. Beide Reaktionsansätze wurden zur Entfernung überschüssiger Kopplungsreagenzien über eine PD-10 Sephadex G-25M Gelfiltrationssäule gegeben, die beim EDC-Kopplungsansatz mit Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) und in den GA-Kopplungsansätze mit Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 9,3) äquilibriert war. Das GA-Kopplungsprodukt wurde somit in Carbonat-Bicarbonatpuffer überführt, anschließend in 2 Aliquots a 1,5 ml geteilt und zu jedem Aliquot jeweils 4,5 mg Peptid A oder Peptid C zugegeben. Zu 3 ml EDC-Kopplungsprodukt wurde 2,5 mg Peptid C zugesetzt. In allen Fällen wurden die Peptide in einem molaren Ueberschuß gegenüber Thyroglobulin von 1:130 bis 1:140 zugegeben. Alle Reaktionsansätze wurden zunächst 2 h bei RT und dann 20 h unter leichtem Schütteln bei 4 C belassen. Anschließend erfolgte bei allen 3 Ansätzen die Abtrennung ungebundener Peptide über eine ACA-44 Ultrogelsäule (Betthöhe: 45 cm; Durchmesser: 1,5 cm) mit PBS-B-Laufpuffer. Die Thyroglobulin-Peptid Konjugat Fraktionen wurden jeweils gesammelt und 2 Tage gegen dest. Wasser dialysiert und schließlich lyophilisiert.

14.2. Peptid Kopplung mit Glutaraldehyd an Hämocyanin

5 mg KLH und jeweils 2,5 mg Peptid A, B (Lys-Asn-Tyr-Val-Arg-Lys-Glu) und C (molares Verhältnis: KLH : Peptiden ungefähr 1:50) wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) gelöst. Anschließend wurde 0,1 ml GA (25%) unter Rühren zugesetzt, der Ansatz zunächst 2 h bei RT und dann bei 4 C über Nacht unter sanftem Schütteln inkubiert. Die Abtrennung ungebundener Peptide erfolgte über die erwähnte ACA-44 Ultrogelsäule. Nach der Reaktion wurden die KLH-Peptid Konjugate 2 Tage gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

14.3. Peptid Kopplung mit SPDP

Die Verwendung des heterobifunktionellen Reagenz SPDP ermöglichte die unidirektionale Protein-Peptid Kopplung ohne die Bildung intramolekularer Bindungen im Peptid (Carlsson et al. 1978).

14.3.1. Konjugation von Peptid A und Thyroglobulin

Peptid A (Tab.6) nahm unter den verwendeten Peptiden eine Sonderstellung ein, da innerhalb seiner Aminosäuresequenz ein Cystein vorkam und die freie SH-Gruppe zur zielgerichteten Kopplung mit SPDP ausgenutzt werden konnte.

Zu 20 mg Thyroglobulin, gelöst in 2 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,5), der 0,1 M Natriumchlorid enthielt, wurde 30 µl SPDP (Endkonzentration: 10 mg/ml in Ethanol) zugegeben. Dies entsprach einem molaren Verhältnis Thyroglobulin:SPDP von 1:30. Nach 45 min Reaktionszeit bei RT wurde überschüssiges SPDP mittels einer PD-10 Sephadex G-25M (Äquilibrierungs- und Laufpuffer: 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 0,1 M Natriumchlorid, pH 7,5) entfernt und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt. Zu dem modifizierten Thyroglobulin wurde Peptid A im molaren Verhältnis von 1:100 zugegeben und der Kopplungsansatz zunächst 3 h bei Raumtemperatur sowie anschließend 12 h bei 4 C leicht geschüttelt. Das Konjugat wurde 2 Tage bei 4 C gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

14.3.2. Konjugation der Peptide B und C mit Thyroglobulin

Die beiden Peptide (Tab.6) wiesen in ihren Aminosäureseitenketten keine freien SH-Gruppen auf und konnten wegen ihres niedrigen Molekulargewichtes nach Reaktion mit SPDP nur schlecht mittels

Gelfiltration von überschüssigem SPDP und Salz befreit werden. Daher wurde Thyroglobulin in 2 Schritten mit SPDP behandelt und auf diese Weise mit N-Hydroxysuccinimid-Ester-Resten modifiziert, so daß die Reaktion mit den Aminogruppen der Aminosäureseitenketten in den Peptiden B und C möglich war. Zunächst wurden 40 mg Thyroglobulin in 4 ml Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) gelöst und mit 60 µl SPDP (10 mg/ml in Ethanol) 45 min bei RT inkubiert. Ueberschüssiges Kopplungsreagenz wurde mit Hilfe einer PD-10 Sephadex G-25M (Äquilibrierungs- und Laufpuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumchlorid, pH 4,5) entfernt und die Proteinfraktionen (6 ml) vereinigt. Zur Reduktion wurde DTT (Endkonzentration: 50 mM) zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Durch Gelfiltration an PD-10 Sephadex G-25M (Äquilibrierungs- und Laufpuffer: 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M Natriumchlorid, pH 7,5) wurde das Reduktionsmittel entfernt und dann erneut 45 min bei RT mit 2 mg SPDP in 200 µl Ethanol inkubiert (molares Verhältnis: 1:100). Die Abtrennung von überschüssigem SPDP erfolgte wiederum durch Gelfiltration. Die Thyroglobulinfraktion wurde in 2 Aliquots zu je 3 ml geteilt und jeweils 4 mg Peptid B oder C im molaren Verhältnis von 1:100 zugegeben. Die Kopplungsansätze wurden zunächst 3 h bei RT und anschließend bei 4 °C sanft geschüttelt. Die Konjugate wurden dann 2 Tage bei 4 °C gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

14.4. Bestimmung der Kopplungsrate durch HPLC Analyse nach SPDP Kopplung

Infolge der SPDP Kopplung werden intermolekulare Disulfidbindungen zwischen Trägerprotein und Peptid geknüpft. Diese können durch reduzierende Reagenzien (β-Mercaptoethanol oder DTT) gespalten und die Protein-Peptid Konjugate wieder quantitativ in Ihre Ausgangskomponenten zerlegt werden. Dadurch kann die Kopplungsrate der Peptide an TG bestimmt werden. Die Quantifizierung der Ausgangskomponenten erfolgte in einer HPLC-Anlage der Firma LKB mit folgender Einrichtung und Laufparametern:

Säule: Ultropac column TSK G-2000 SW (7,5 x 300 mm);
Monitor: LKB 2151 (Absorption: 220 nm; Abs. Range: 0,08)
Pumpe: LKB 2150 (Flußrate: 1,0 ml/min; Druck: 14 bar)
Laufpuffer: 50 mM Trifluoressigsäure

Zunächst wurden Eichkurven der verwendeten Peptide und von Thyroglobulin, die in 0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,6) gelöst waren, erstellt. Es wurden verschiedene Mengen dieser Substanzen aufgetragen, der dem jeweiligen Peptid oder Thyroglobulin entsprechende Peak identifiziert und die Peak-Fläche der Eichkonzentrationen berechnet.

Ein Alliquot der jeweiligen Peptid-TG Konjugate wurde in 0.02 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,6) gelöst und mit 50 mM DTT oder 0,1 M β -Mercaptoethanol (angegeben sind Endkonzentrationen) reduziert, durch HPLC aufgetrennt und die Fläche unter dem jeweiligen Peptidpeak oder Thyroglobulinpeak berechnet. Durch mehrmalige Wiederholung mit beiden Reduktionsmitteln und unterschiedlichen Mengen der eingesetzten Konjugate konnte das molare Verhältnis zwischen gekoppeltem Peptid und TG im Vergleich mit den eingesetzten Eichsubstanzen ermittelt werden.

14.5. Immunisierung

Die Immunogene wurden in physiologischer Kochsalzlösung in Konzentrationen von 1 mg/ml aufgenommen und zur Applikation mit dem gleichen Volumen Freund's komplettem Adjuvans (CFA) oder inkomplettem Adjuvans (ICFA) emulgiert. Allen Kaninchen wurde bei der Erstimmunisierung in CFA emulgiertes Immunogen (jeweils 250 μ g Protein-Peptidkonjugat oder Fusionsprotein) appliziert. Bei allen weiteren Immunisierungen wurde ICFA verwendet. Die Applikation erfolgte intradermal an vielen Stellen auf dem Rücken, subcutan in die Laufbeugen und intramuskulär in die hinteren Oberschenkel. 4 Wochen nach der ersten Applikation wurde bei jedem Kaninchen eine Booster-Immunisierung mit 500 μ g Immunogen in ICFA durchgeführt und eine Woche später Blut aus der Ohrvene abgenommen. Im Abstand von 4 Wochen wurden die Kaninchen erneut immunisiert und jeweils eine Woche später Blut abgenommen. Diejenigen Kaninchen, die einen hohen Antikörpertiter gegen das entsprechende Immunogen aufwiesen, wurden erst nach Abfall des Titers erneut immunisiert.

15. Antikörperpräparation

15.1. Gewinnung von Seren und IgG

Um die Kontraktion des Blutkuchens zu ermöglichen, wurde geronnenes Blut zunächst 1 h bei RT belassen und dann über Nacht bei 4 C gekühlt. Am nächsten Tag wurde das Serum abgenommen und

20 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die Gammaglobulinfraktion wurde durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnen. Zu 2 Volumen Serum wurde 1 Volumen gesättigtes Ammoniumsulfat zugegeben und abzentrifugiert. Das Pellet wurde im gleichen Volumen 17,5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,3) resuspendiert und der Vorgang 3 x wiederholt. Ueber Nacht wurde gegen 17,5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,3) dialysiert und die Gammaglobulinfraktion durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose mit 17,5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,3) als Laufpuffer gereinigt. Der Säulendurchlauf entsprach den Gammaglobulinen. Die IgG Fraktionen wurden gegen PBS-B dialysiert, mit 1% BSA portioniert und bei -20 C eingefroren.

15.2. Immobilisierte Peptide für die Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der Peptid A spezifischen Antikörper wurde das Peptid an Thiopropyl-Sepharose 6b (Axen et al. 1975) über die freie SH-Gruppe im Cystein gekoppelt, so daß der gleiche Kopplungsmodus wie im Peptid-A-TG Konjugat vorlag. 0,5 g Sepharose wurde mit 100 ml entgastem dest. Wasser (pH 7,0) gequollen und in 1,5 ml Kopplungspuffer (0,1 M Tris, 0,5 M Natriumchlorid, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen. Es wurden 30 mg Peptid A zugegeben (Molares Verhältnis: 2-Pyridyl-Disulfitreste : Peptid A = 1 : 1) und zunächst 2 h bei RT und anschließend bei 4 C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde 3 x mit je 100 ml Kopplungspuffer gewaschen. Zur Reduktion verbliebener reaktiver Gruppen wurde das Harz mit 50 uM β -Mercaptoethanol in 0,1 M Natriumacetat und 0,1 M Natriumchlorid (pH 4,5) inkubiert. Anschließend wurde 4 x mit 50ml PBS-B gewaschen.

15.3. Affinitätschromatographische Reinigung peptidspezifischer Antikörper

Die Gammaglobulinfraktion aus 5 ml Antiserum gegen Peptid A wurde mit 1,5 ml Peptidharz (an Thiopropyl-Sepharose 6b gebundenes Peptid A) in PBS-B über Nacht bei 4 C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Dann wurde das Harz in eine Bio-Rad Econo-Säule (Durchmesser: 0,5 cm; Länge: 10 cm) gegeben. Die Elution der spezifischen Anti-Peptid-A-Antikörper erfolgte schrittweise (Seckler et al. 1983):

- 1) Waschen mit 2 ml Borat-Saline, 0,05% Triton, pH 8,5
- 2) Waschen mit 2 ml Borat-Saline, pH 8,5
- 3) Waschen mit 1,5 ml 0,1 M Tris, 0,5 M Natriumchlorid, pH 8,0
- 4) Waschen mit 1,5 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,0
- 5) Elution mit 1,5 ml 0,2 M Glycin/Salzsäure, pH 2,5
- 6) Neutralisation mit 1,5 ml 0,3 M Dinatriumtetraborat, pH 8,5
- 7) Dialyse gegen PBS-B

Nach der Dialyse wurde die Peptid A spezifische IgG-Fraktion in Gegenwart von 1 mg/ml BSA bei -20 C portioniert und eingefroren.

15.4. Immobilisierung von Antikörpern für die Immunadsorption

Nach Elution mit 0,2 M Glycin (pH 2,5) und Neutralisation mit 0,3 M Dinatriumtetraborat (pH 8,5) wurden die Anti-peptidantikörper A3 (Tab.8) gegen 0,5 M Natriumchlorid und 0,1 M Natriumhydrogencarbonat (pH 7,5) dialysiert. 1 mg Peptid A spezifische Immunglobuline (entsprach 2,5 ml IgG Lösung in Dialysepuffer) wurde mit 3 g aktivierter Sepharose 4b, die zuvor in 1 mM kalter Salzsäure gequollen (200 ml/g) und anschließend mit Kopplungspuffer (0,5 M Natriumchlorid und 0,1 M Natriumhydrogencarbonat, pH 7,5) gewaschen wurde, in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 9 ml Kopplungspuffer zunächst 2 h bei RT und danach für 4 h bei 4 C gekoppelt. Die Lösung wurde durch Abnutschen entfernt und das Harz mehrmals mit Kopplungspuffer gewaschen, danach 4 x abwechselnd mit 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M Natriumchlorid, pH 4,0 und 0,1M Tris, 0,5M Natriumchlorid, pH 8,0 und anschließend in 9 ml 0,1 M Tris, pH 8,0 aufgenommen und darin 2 h bei RT zum Abblocken freier Bindungsstellen geschüttelt. Der letzte Waschvorgang erfolgte mehrmals mit PBS-B. Das Säulenmaterial wurde in PBS-B in Gegenwart von 0,02% Natriumazid aufbewahrt.

16. Immunadsorption von Protein-E aus Zellmembranen von E. coli

Die Membranfraktion von E. coli pop2135(pSB12) wurde nach Gen E Expression isoliert. Die Membranfraktion von pop2135(pSB22), die kein Protein-E aufweist (vergl. Ergebnisteil A: Punkt 1.2.), wurde als Kontrolle eingesetzt. Die Prozedur war für beide Ansätze identisch. Die jeweilige Membranfraktion wurde zunächst 1 x mit 5 ml PBS-B gewaschen, zur Solubilisation in 2 ml PBS-B, 0,5% DOD (Wright und Overath 1984) aufgenommen und 1 h bei RT geschüttelt.

Der Ansatz wurde dann auf 10 ml mit PBS-B, β -Mercaptoethanol (Endkonz: 1 mM) und DOD (Endkonz: 0,1%) verdünnt, zur besseren Solubilisierung 30 Sekunden beschallt, 5 min im Ja20 Rotor bei 10 KUpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Ueberstand für die Immunadsorption verwendet. Das hergestellte Antikörperharz (III/15.4.) wurde unter sanftem Schütteln über Nacht in Gegenwart von PBS-B, 1 mM β -Mercaptoethanol, 0,1% DOD und 0,02% Natriumazid mit 10 ml der solubilisierten Membranfraktion inkubiert. Nach Packung der Säule, (Bio-Rad Econo-Säule: Durchmesser: 0,7 cm; Länge: 10 cm) wurde mit PBS-B, 1 mM β -Mercaptoethanol und 0,1% DOD gewaschen, bis im Durchlauf bei 280 nm kein Protein mehr meßbar war. Zur Entfernung von unspezifisch adsorbierten Proteinen erfolgte die Proteindesorption von den Antipeptidantikörpern in mehreren Schritten (Zoller und Matzku 1976). Im ersten Schritt wurde mit 10 ml 0,1 M Glycin, 0,1% DOD, pH 10 gewaschen, anschließend mit 10 ml 0,1 M Glycin, 1 M Natriumchlorid, 0,1% DOD, pH 10 präeluiert und schließlich mit 10 ml 3 M Natriumrhodanid und 0,1% DOD eluiert. Nach Dialyse gegen Wasser und Gefriertrocknung wurden die Präeluat- und Eluatfraktionen der immunadsorbierten Membranproteine von E. coli pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) in Protein-Probepuffer gelöst und gelelektrophoretisch analysiert.

17. Immunchemische Testsysteme

17.1. ELISA

Die Reaktivität von Antiseren und gereinigten Antikörpern mit den Peptiden wurde im indirekten ELISA untersucht (Seckler et al. 1983). Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten aus Polyvinylchlorid (Dynatech, Denkendorf) mit den freien Peptiden, wurden pro Vertiefung ca. 100 pmol Peptid aus 25-50 μ l wässriger Lösung bei 37 C eingetrocknet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Vertiefungen mit je 200 μ l 20 mg/ml BSA in Borat-Saline gefüllt. Danach wurden die Platten 2 x mit 0,05% Triton X-100 in Borat-Saline und mit Borat-Saline gewaschen. Die Inkubationen mit Verdünnungsreihen der Antiseren (bzw. der gereinigten Antikörper) und mit den Indikatorantikörpern (Alkalische Phosphatase-Konjugat von Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, 1:1000 Verdünnung) erfolgten jeweils 1-3 h bei 37 C oder über Nacht bei 4 C (100 μ l pro Vertiefung; alle Verdünnungen in Borat-Saline, 1 mg/ml BSA). Zwischen den

einzelnen Schritten wurden die Platten, wie oben erwähnt, gewaschen. Zuletzt wurde mit Substratpuffer gewaschen und die Vertiefungen mit 100 μ l 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer gefüllt. Nach 10-30 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 3 N Natriumhydroxid gestoppt und die Extinktionen in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 405 nm gegen einen Leerwert (kein erster Antikörper oder 1:15000 Verdünnung des Präimmunserums) gemessen. Als Titer eines Antiserums wurde die Verdünnung festgelegt, bei der die Extinktion doppelt so hoch war, wie bei der höchsten Konzentration des Präimmunserums (1:10 Verdünnung) im ELISA gegen das entsprechende Peptid oder des Antiserums in antigenfreien Vertiefungen.

17.2. Immunoblot

Die Proteine wurden nach Auftrennung in der SDS-PAGE auf Nitrocellulosefilter (Porengröße: 0,1 μ m) übertragen (Towbin et al. 1979; Burnette 1981).

Der Elektrottransfer erfolgte für 2,5 Stunden bei 250 mA in Transblotpuffer unter Eiskühlung. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Nitrocellulosefilter 2 x 15 min bei 37 C mit je 75 ml 0,05% Tween 20 in 1 x PBS-A inkubiert. Die gleiche Lösung (Batteiger et al. 1982) wurde zum Verdünnen der Antikörper (1:100-1:500) verwendet. Die Antikörperlösung wurde 3 h bei 37 C oder über Nacht bei 4 C mit dem Filter inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit je 50 ml 0,05% Tween 20 in PBS-A gewaschen, der biotinylierte Antikaninchenantikörper (Verdünnung: 1:625) in PBS-A und 1% BSA zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde wiederum 3 x für jeweils 5 min mit 0,05% Tween 20 in PBS-A gewaschen und der Streptavidin-Peroxidase Komplex (Hsu und Fanger 1981) in einer Verdünnung von 1:400 in PBS-A und 1% BSA für 30 min mit dem Filter inkubiert und dann 3 x für 5 min mit 0,05% Tween 20 in PBS-A gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde der Nitrocellulosefilter schließlich mit einem chromogenen Substrat für die konjugierte Peroxidase inkubiert. Die Substratlösung bestand aus 20 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol (0,02%) gelöst in 0,5 ml Ethanol in 50 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5), der 0,93% Wasserstoffperoxid enthielt.

18. Quantifizierung von Proteinen

Die quantitative Auswertung der Fluorogramme erfolgte mit Hilfe eines LKB Ultro Scan Laser Densitometers.

19. Computer Programme

19.1. Programme zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen

Die Programme zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen sind für VAX 750 geschrieben und basieren auf den Vorhersagen von Chou und Fasman (1974a,b), Argos et al. (1978), Granier et al. (1978), Cohen et al. (1984) sowie den Parametern der Hydrophilizitätsberechnungen (Hopp und Woods 1981), der Oberflächenwahrscheinlichkeit (Emini et al. 1985) und der Flexibilität (Karplus und Schulz 1985) der im Protein vorhandenen Aminosäuren.

19.2. Programm zur Sekundärstrukturanalyse von m-RNA

Das Programm wurde publiziert (Lang und Burger, 1986).

IV. ERGEBNISSE

A. Kontrolle der Gen E Expression und der Protein-E Lyse

In diesem Abschnitt wurde die Kontrolle der Gen E Expression auf translationaler Ebene und der Einfluß des phagencodierten Protein-K auf die PhiX174 Lyse und Protein-E induzierte Lyse von E. coli untersucht.

1. Klonierung von Gen E unter die Transkriptionskontrolle von Lambda pL

Die kontrollierte Expression von Gen E unter der Kontrolle des lac Promotors war ausschließlich in E. coli lac Repressor Ueberproduzenten möglich (Henrich et al. 1982a). In diesen E. coli Stämmen, die nur eine partielle Induktion des lac Kontrollsystems erlauben (Backmann et al. 1976), trat die Lyse zwischen 20 und 65 Minuten (Henrich 1983b) nach Gen E Expression von Plasmid pUH12 (Gen E unter der Kontrolle des lac Promotors) ein.

Zur Expressionssteigerung wurde Gen E der Kontrolle von Lambda pL unterstellt, der gegenüber dem lac Promotor eine 5-6 fach höhere Promotorstärke aufweist (H. Bujard: Struktur und Funktionsbeziehungen an Promotoren, Seminarvortrag MPI für Biochemie München, April 1986). Es war denkbar, daß die partielle Induktion des lac Kontrollsystems zur relativ schwachen Expression von Gen E in Plasmid pUH12 beitrug. Es sollte daher gleichzeitig überprüft werden, ob die Gen E Expression unter Lambda pL über den Faktor der höheren Promotorstärke von Lambda pL gegenüber dem lac Promotor hinaus gesteigert werden kann. Allerdings war nicht bekannt, ob die Repression von Lambda pL zur Kontrolle der letalen Gen E Funktion ausreichend war.

Lambda pL kann durch den thermosensitiven cI Repressor, der das Produkt des mutierten cI Gens (cI857 Allel) darstellt, reguliert werden. Unter diesen Bedingungen sind die Lambda pL nachgeschalteten Gene bei 28 C reprimiert, während durch Inaktivierung des cI857 Repressors eine starke Expression dieser Gene nach Temperaturerhöhung auf 42 C erzielt werden kann (Remault et al. 1981). Die Transkriptionskontrolle von Lambda pL kann entweder in geeigneten E. coli Stämmen (E. coli K12 Δ HI Δ trp; E. coli pop2135), die einen defekten Lambda Prophagen mit der

Repressormutation cI857 enthalten, oder durch die Transformation von E. coli Stämmen mit dem Plasmid pcI857 (Remaut et al. 1983) erfolgen. Das Plasmid trägt das cI857 Allel und verleiht Resistenz gegen Kanamycin.

1.1. Konstruktion der Plasmide pSB12 und pSB22

In Plasmid pSB12 wurde Gen E der Kontrolle von Lambda pL unterstellt. In Plasmid pSB22 wurde die gleiche DNA-Region aus PhiX174am3 (amber Mutation in Gen E) kloniert. Plasmid pSB22 sollte in Expressionsstudien als Kontrollplasmid zur eindeutigen Identifizierung von Protein-E eingesetzt werden.

Als Quelle für beide DNA-Regionen boten sich die Plasmide pUH12 (wt-Allel von Gen E) und pUH22 (am3-Allel von Gen E) an (Henrich et al. 1982a). Aus diesen beiden Plasmiden konnte Gen E, das der Region von Nukleotid 568-843 auf der PhiX174 DNA entspricht (Sanger et al. 1978), auf einem 1011er EcoRI Fragment reisoliert werden. Das 1011er EcoRI Fragment umfasst den Abschnitt von Nukleotid 447-1453 der PhiX174 DNA (Henrich et al. 1982a).

Das Fragment trägt außer Gen E noch Teilsequenzen der Gene D (Nukleotid 390-848 auf der PhiX174 DNA) und F (Nukleotid 1001-2284 auf der PhiX174 DNA), sowie das intakte Gen J (Nukleotid 848-964 auf der PhiX174 DNA). Die zur Klonierung verwendeten EcoRI Fragmente aus pUH12 und pUH22 unterscheiden sich lediglich in Nukleotid 587 der PhiX174 DNA Sequenz, dessen G--->A Austausch die am3 Mutation in Gen E hervorruft. Zur Klonierung von Gen E unter Lambda pL wurde Plasmid pLc236 (Remaut et al. 1981) ausgewählt, das eine EcoRI Einzelschnittstelle hinter Lambda pL enthält.

Die Konstruktion von Plasmid pSB12 (E-wt Allel) ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Konstruktion von Plasmid pSB22 (E-am3 Allel) erfolgte analog.

Nach Isolierung der 1011er EcoRI Fragmente aus pUH12 respektive pUH22 wurden diese in den mit EcoRI linearisierten Vektor pLc236 ligiert. Nach der Transformation des Ligaseansatzes in E. coli K12 HI trp wurde auf Amp Platten bei 28 C selektioniert.

Da im Rahmen dieser Arbeit viele neukonstruierte rekombinante Plasmide nicht durch direkten Nachweis der inserierten DNA-Fragmente (bspw. Insertionsinaktivierung von Antibiotikaresistenzgenen oder Ausfall von Enzymaktivitäten) selektioniert werden konnten, soll

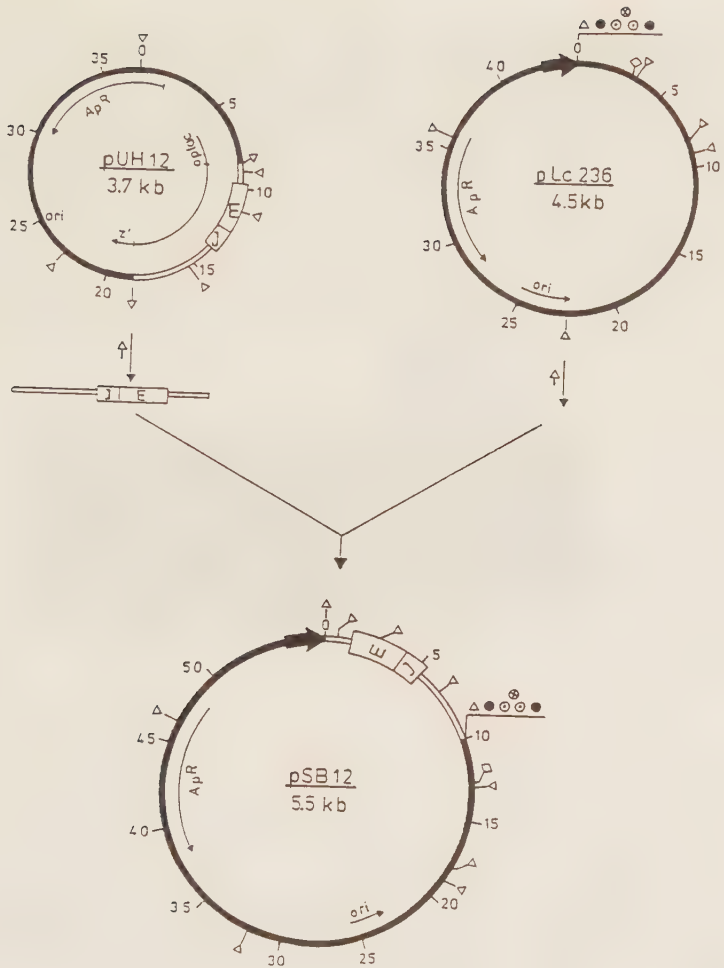


Abb.3: Konstruktion von Plasmid pSB12

Die Konstruktion ist im Text beschrieben. Die Plasmidkarten sind in Abschnitte von 500 bp unterteilt. Der offene Balken beinhaltet PhiX174 DNA. E und J repräsentieren PhiX174 Gene. o, p: lac Operator und Promotor; Lambda pL ist durch einen Pfeil, der zugleich die Transkriptionsrichtung angibt, dargestellt. Symbole für Restriktionsenzyme: Δ EcoRI; ▽ TaqI; ● BamHI; ○ HindIII; ⊗ BclI; ◇ SalI;

an Hand der Plasmidkonstruktionen pSB12 und pSB22 die Selektion rekombinanter Plasmide dargestellt werden.

Zur Isolierung der gesuchten Plasmide wurden jeweils Aliquots aus Uebernachtkulturen 5 verschiedener Amp resistenter Klone vereinigt und aus mehreren solcher "Pools" Plasmid-DNA präpariert. Nach gelelektrophoretischer Analyse und Größenvergleich der isolierten Plasmid DNA mit dem Ausgangsvektor pLc236 wurden nur solche "Pools" weiter charakterisiert, die Plasmide mit höherem Molekulargewicht enthielten (Abb.4:'*').

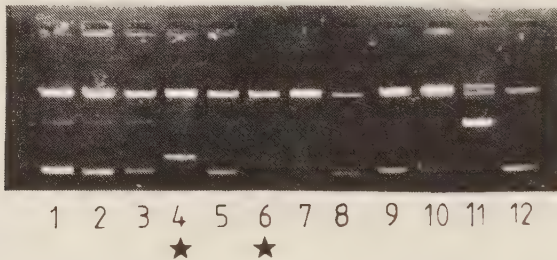


Abb.4: Analyse von Plasmid-DNA aus Ampicillin resistenten Transformanten

Die "gepoolte" DNA aus 5 verschiedenen Ampicillin resistenten Klonen (Spur 1-11) wurde im Vergleich mit dem Ausgangsvektor pLc236 auf einem 0,8% Agarosegel aufgetragen. Die "Pools" 4 und 6 (★) wurden näher charakterisiert, da sie Plasmide mit größerem Molekulargewicht enthielten.

Im Anschluß wurde von jedem einzelnen Klon eines positiven "Pools" PLasmid DNA präpariert, wodurch bei der Konstruktion von Plasmid pSB12 drei Klone mit "Inserts" und im Falle von Plasmid pSB22 zwei inserttragende Plasmide isoliert werden konnten. Der EcoRI Verdau dieser Plasmide lieferte 2 Fragmente, die dem

Klonierungsvektor pLc236 sowie den 1011er Fragmenten aus Plasmid pUH12 respektive Plasmid pUH22 entsprachen (Abb.5A). Durch die ungerichtete Klonierung konnte das 1011er EcoRI Fragment jeweils in beiden möglichen Orientierungen in der EcoRI Schnittstelle von pLc236 inseriert sein.

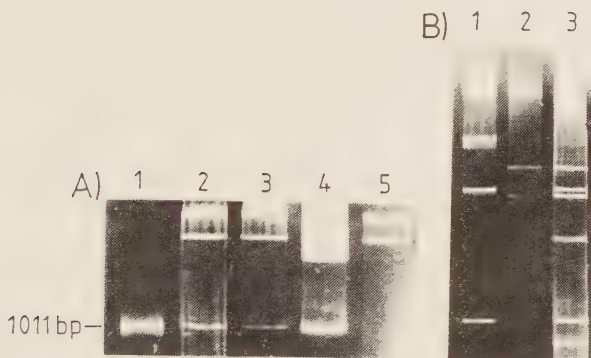


Abb.5: Restriktionsanalyse der Plasmide pSB12 und pSB22

A: EcoRI Verdau:

Die Plasmide pSB12 (Spur 2), pSB22 (Spur 3), pUH12 (Spur 4) und pLc236 (Spur 5) wurden mit EcoRI gespalten und in einem 2% igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde 1011er EcoRI Fragment aus pUH12 aufgetragen (Spur 1).

B: TaqI Verdau:

Die Plasmide pLc236 (Spur1), pSB12 (Spur2) und pSB22 (Spur3) wurden mit TaqI verdaut und in einem 6% PAA-Gel aufgetrennt.

Da nur eine Orientierung (Gen E mit seinem 5' Ende zu Lambda pL orientiert) die sinnvolle Transkription von Gen E ermöglichte, konnte das gesuchte Plasmid pSB12 leicht unter den 3 in Frage kommenden Klonen durch den einfachen Lyse Test gefunden werden. Durch Temperaturerhöhung von 28 C auf 42 C und damit einhergehender Inaktivierung des cI857 Repressors sollten die plasmidtragenden Klone durch Protein-E Wirkung lysiert werden, die Plasmid pSB12 enthielten. Aufgrund dieser Funktionstests

konnte Plasmid pSB12 (Abb.3) aus einem der 3 erwähnten Klone isoliert werden.

Durch Inaktivierung des cI Repressors war in Plasmid pSB22 tragenden Klonen auch im Falle der 5' Orientierung des am3 Allels von Gen E zu Lambda pL keine Lyse der Zellen zu erwarten, da die am3 Mutation im Gen E die Synthese von Protein-E verhindert. Die gesuchte Orientierung konnte durch Vergleich der TaqI Fragmentmuster der in Frage kommenden Hybridplasmide mit dem isolierten Plasmid pSB12 bestimmt werden. In Abbildung 5B sind die TaqI Spaltungen von Plasmid pLc236 und Plasmid pSB12 im Vergleich mit Plasmid pSB22 (entspricht einem der beiden isolierten Klone) dargestellt. Die Fragmentmuster von pSB12 und pSB22 waren identisch. Dadurch konnte die gesuchte Orientierung des 1011er EcoRI Fragmentes in Plasmid pSB22 bestätigt werden.

1.2. Lyse von E. coli nach Gen E Expression von den Plasmiden pSB12 und pSB22

Nach Induktion der Gen E Expression stellen der Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Lyserate ein empfindliches Maß für die synthetisierte Menge an Protein-E pro Zeiteinheit dar.

Nach Inaktivierung des thermosensitiven cI Repressors durch Temperaturerhöhung auf 42 C lysierten exponentiell wachsende E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB12) innerhalb von 10 Minuten. Der optisch meßbare Beginn der Lyse trat 6 Minuten nach Induktion der Gen E Expression ein (Abb.6).

Die Lyserate war wesentlich höher als in PhiX174 infizierten Zellen (Lubitz et al.1984a) oder mit Plasmid pUH12 (Henrich et al. 1982a). Bis zum meßbaren Eintritt der Lyse benötigt PhiX174 nach Infektion von E. coli C zwischen 30 und 40 Minuten, während Plasmid pUH12 tragende E. coli Zellen nach Induktion der Gen E Expression in Abhängigkeit vom Wirtsstamm und der lac Repressorkonzentration zwischen 20 und 65 min (Henrich et al. 1983b) benötigen.

In E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB22) hatte die Inaktivierung des cI857 Repressors keinen Einfluß auf das Wachstum der Zellen und Anzeichen von Lyse waren nicht zu beobachten (Abb.6). Dies zeigte, daß die Synthese von Protein-E durch die am3 Mutation verhindert wird und daß keine anderen Funktionen, die auf dem klonierten Fragment der PhiX174 DNA liegen, das Wachstum der Wirtsbakterien beeinträchtigt.

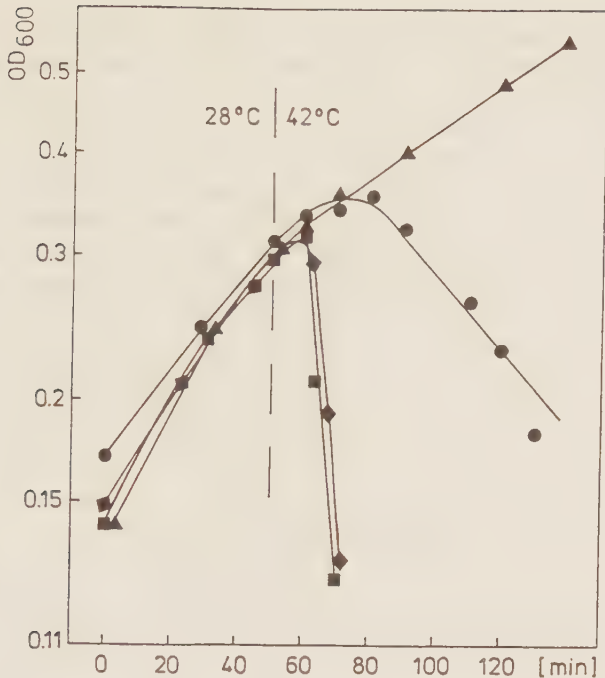


Abb. 6: Gen E Expression von den Plasmiden pSB12 und pSB22

Die E. coli Stämme K12ΔHIΔtrp(pSB12) (■), K12ΔHIΔtrp(pSB22) (▲), HF4714(pcI857,pSB12) (◆) und HF4714(pcI857,pSB22) (●) wurden bei 28 C in LB-Medium in Gegenwart der entsprechenden Antibiotika angezogen. Zu dem Zeitpunkt, der durch die unterbrochene Linie gekennzeichnet ist, erfolgte Temperaturerhöhung auf 42 C.

Durch Expression von Plasmid pSB22 im amber Supressor Stamm E. coli HF4714, der zuvor mit dem Repressorplasmid pcI857 transformiert wurde, kann auch von Plasmid pSB22 aus funktionelles Protein-E gebildet werden. In E. coli

HF4714(pcI857,pSB22) war der Lysebeginn gegenüber E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) um ungefähr 20 min verzögert und die Lyserate reduziert (Abb.6). Obwohl die Suppressor t-RNA im Stamm HF4714 nicht identifiziert ist, zeigte der positive Lysetest, daß die an Stelle des am3 Codons eingefügte Aminosäure die Protein-E Funktion nicht stark beeinträchtigt. Das Lyseverhalten von E. coli HF4714(pcI857,pSB12) und K12 Δ HI Δ trp(pSB12) war hingegen nahezu identisch (Abb.6). Darüber hinaus bestätigte der positive Lysetest in E. coli HF4714(pcI857,pSB22) zusätzlich die gesuchte Orientierung des 1011er EcoRI Fragmentes in Plasmid pSB22. Das Wachstum von E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) war unter reprimierten Bedingungen bei 28 C nicht beeinträchtigt. Dies zeigte gleichzeitig, daß eine chromosomale Kopie des cI857 Allels in E. coli K12 Δ HI Δ trp auch in Gegenwart eines "multi copy" Plasmides zur Repression der letalen Gen E Funktion ausreicht.

1.3. Nachweis der plasmidcodierten Proteine von pSB12 und pSB22

Der rasche Lyseeintritt von E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) nach Gen E Expression ließ erwarten, daß die gegenüber Plasmid pUH12 (Gen E unter der Kontrolle des lac Promotors) gesteigerte Gen E Expression von Plasmid pSB12 den Nachweis von Protein-E in der SDS-PAGE erleichtert. Der Protein-E Nachweis sollte in E. coli K12 Δ HI Δ trp und E. coli Minizellen erbracht werden. Das Kontrollplasmid pSB22 (am3 Mutation in Gen E) diente zur eindeutigen Identifizierung von Protein-E.

Wie bereits erwähnt beinhaltet das klonierte 1011er EcoRI Fragment in den Plasmiden pSB12 und pSB22 nicht nur Gen E, sondern auch Teile der Gene D und F, sowie Gen J. Zur eindeutigen Zuordnung der plasmidcodierten Proteine in der SDS-PAGE wurden deshalb die Sequenzdaten der Lambda pL nachgeschalteten Gene in den Plasmiden pSB12 und pSB22 zusammengestellt.

1.3.1. Sequenzanalyse der Plasmide pSB12 und pSB22

Die bekannten Nukleotidsequenzen von Plasmid pBR322 (Sutcliffe 1979; Peden 1983) und der PhiX174 DNA (Sanger et al. 1978) ermöglichten die Aufstellung der Lambda pL nachgeschalteten DNA Sequenzen von den Plasmiden pSB12 und pSB22. Dadurch konnte auch das Molekulargewicht des jeweils codierten F'-Hybridproteins, das durch Genfusion zwischen dem Gen F Anteil (F') auf dem klonierten

1011er EcoRI Fragment und DNA Sequenzen der tet Gen Region von Plasmid pLc236 gebildet wird, berechnet werden. Die Nukleotid und Aminosäuresequenz des translatierten F'-Fusionsproteins ist im Anhang (1.) wiedergegeben.

Der Gen D Anteil kann in kein Protein übersetzt werden, da hinter dem Lambda pL auf beiden Plasmiden keine Ribosomenbindungsstelle vorhanden ist (Remault et al. 1981) und das Gen D spezifische Translationsinitiationssignal fehlt.

Demnach ist von den Plasmiden pSB12 und pSB22 die Synthese folgender Genprodukte unter der Kontrolle von Lambda pL möglich:

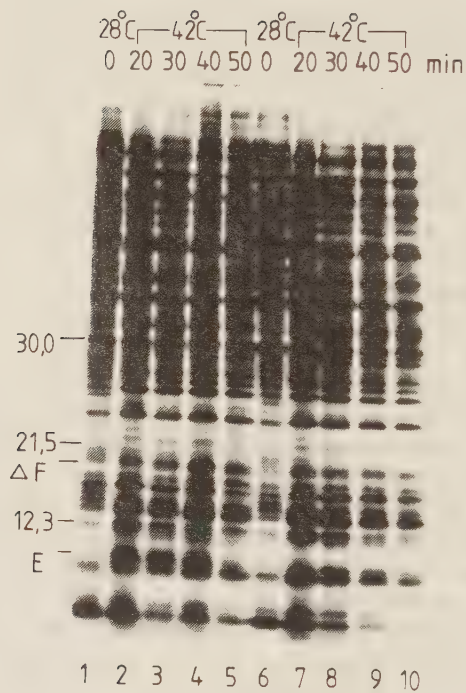
	pSB12:	pSB22:
E Protein: 10,0 kd	+	-
J Protein: 5,0 kd	+	+
F' Protein: 19,5 kd	+	+

1.3.2. Nachweis von Protein-E in E.coli K12 Δ HI Δ trp

Zum Nachweis von Protein-E in E. coli K12 Δ HI Δ trp wurden Plasmid pSB12 und pSB22 Transformanten in supplementiertem DM-Medium bis zur OD 600 von 0.5 angezogen. Die Expression der Lambda pL nachgeschalteten Gene wurde anschließend durch Temperaturerhöhung auf 42 C induziert. Nach Wachstum in DM-Minimalmedium trat die Protein-E induzierte Lyse im Gegensatz zu LB-Medium (vergl. Abb.6) erst 30 bis 40 Minuten nach Induktion der Gen E Expression ein. Die Pulsmarkierung von E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) und K12 Δ HI Δ trp(pSB22) mit 35-S-Methionin erfolgte deshalb erst 20, 30, 40 und 50 min nach Temperaturerhöhung auf 42 C. Es wurden jeweils 100 ul Bakterienkultur zu 10 uCi 35-S-Methionin gegeben und für 2 min bei 42 C weiterinkubiert. Nach Zugabe von 100 ul 10% TCA wurde der Ansatz in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 20 ul Laemmli Protein Probepuffer aufgenommen und 4 min bei 100 C gekocht. Ebenso wurden E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) und K12 Δ HI Δ trp(pSB22) unter nicht induzierten Bedingungen bei 28 C mit 35-S-Methionin markiert. Bei 28 C sind die dem Lambda pL nachgeschalteten Gene reprimiert.

Die Proteinmuster der Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert. Pro Probe wurde jeweils der Gesamtansatz aufgetragen. Das Fluorogramm des 14-20% PAA-Gels ist in Abbildung 7A dargestellt.

(A)



(B)

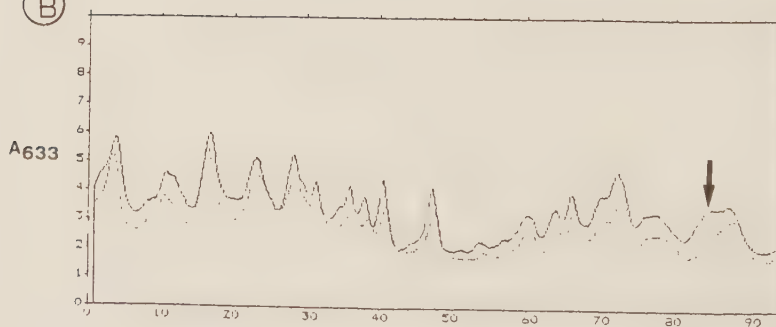


Abb.7: Synthese von Protein E in E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12)

**A: Proteinmuster der 35-S-Methionin markierten
Proteine von E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) und
E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB22) bei 30 C und 42 C**

Die synthetisierten Proteine von E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) (Spur 1-5) und E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB22) (Spur 6-10) wurden mit 35-S-Methionin markiert und in der 14-20% igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Zeitpunkt der Pulsmarkierung nach Temperaturerhöhung auf 42 C und die jeweiligen Inkubationstemperaturen sind oberhalb des Fluorogrammes angegeben. Das Molekulargewicht (kd) der Proteinmarker, sowie die Positionen von Protein E (E) und des F'-Fusionsproteins (Δ F) sind dargestellt.

B: Quantifizierung von Protein-E in E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12)

Die Spuren 4 und 9 des Fluorogrammes von Abb.7A wurden densitometrisch analysiert. Verglichen wurden jeweils die Proteinmuster der Pulsmarkierung nach 40 Minuten Inkubationszeit bei 42 C.

(1111) Scan des Proteinmusters von K12 Δ HI Δ trp(pSB12)

(....) Scan des Proteinmusters von K12 Δ HI Δ trp(pSB22)

Die Position von Protein-E ist durch einen Pfeil angegeben.

Unter induzierten Bedingungen konnte Protein-E im Proteinmuster von K12 Δ HI Δ trp(pSB12) in den Spuren 2, 3 und 4 (Abb.7A) nachgewiesen werden. Die gefundene Molekulargewichtsposition lag bei ungefähr 10 kd. Die Proteinbande trat im Proteinmuster von K12 Δ HI Δ trp(pSB22), der als Kontrolle diente, nicht auf (Abb.7A: Spur 7, 8, 9 und 10). Die Position von Protein-E im PAA-Gel wurde darüber hinaus durch die Abwesenheit der Protein-E spezifischen Bande im Proteinmuster von K12 Δ HI Δ trp(pSB12) unter reprimierten Bedingungen (Abb.7A: Spur 1) bestätigt.

Das Fehlen von Protein-E in Spur 5 (Abb. 7A) zeigte ferner, daß Protein-E bis zum Lyseeintritt synthetisiert wird. Nach 40 Minuten (Lysebeginn in DM-Minimalmedium) war keine Pulsmarkierung von Protein-E mehr möglich.

Im Densitogramm (Abb.7B) war die Position von Protein-E im Proteinmuster von K12 Δ HI Δ trp(pSB12) gegenüber dem Proteinmuster von K12 Δ HI Δ trp(pSB22) ebenfalls sichtbar. Die Quantifizierung von Protein-E in K12 Δ HI Δ trp(pSB12) ergab, daß der prozentuale Anteil von Protein-E am gesamt markierten Zellprotein nur 1,1% betrug. Das F'-Fusionsprotein (19,5 kd) konnte in den Proteinmustern von K12 Δ HI Δ trp(pSB12) und K12 Δ HI Δ trp(pSB22) durch Vergleich der induzierten Proben (Spur 2, 3, 4, 5 ,7, 8, 9, 10) mit nicht

induzierten Proben (Spur 1 und 6) identifiziert werden (Abb.7A). Der Nachweis von Protein-J (5 kd) war nach 35-S-Methionin Markierung nicht möglich, da in seiner Aminosäuresequenz außer dem N-terminalen Methionin, das möglicherweise abgespalten wird, kein weiteres Methionin vorkommt.

1.3.3. Nachweis der plasmidcodierten Proteine von pSB12 und pSB22 in Minizellen

Zur Reduktion der markierten Wirtszellproteine wurden die Plasmide pSB12 und pSB22 im E. coli Minizellstamm DS410 exprimiert. Gleichzeitig sollte die synthetisierte Menge an Protein-E relativ zu anderen plasmidkodierten Proteinen bestimmt werden.

Dazu wurde der Minizellstamm zunächst mit dem Repressorplasmid pcI857 transformiert. Anschließend erfolgte die Transformation mit den Plasmiden pSB12 bzw. pSB22. Die Reinigung der Minizellen und die Markierung der plasmidcodierten Proteine mit 35-S-Methionin wurde im Methodenteil (Punkt 8 und 9) beschrieben. Die Markierung von DS410(pcI857,pSB12), DS410(pcI857,pSB22), DS410(pcI857) und DS410 erfolgte jeweils bei 42 C zur Expression der Lambda pL nachgeschalteten Gene von Plasmid pSB12 und Plasmid pSB22.

Die markierten Minizellproteine wurde in der 14-20% SDS-PAGE analysiert (Abb.8A). In den Spuren 1-3 (Abb.8A) wurden jeweils 220000 cpm und in Spur 4 (Abb.8A) 45000 cpm aufgetragen.

Abb.8: Synthese von Protein-E in E. coli Minizellen

A: Proteilmuster der plasmidcodierten Proteine der Plasmide pSB12, pSB22 und pcI857 in E. coli DS410

Das Fluorogramm zeigt die mit 35-S-Methionin markierten Proteine (Markierung erfolgte bei 42 C) von E. coli DS410, der die Plasmide pSB12 und pcI857 (Spur 1), pSB22 und pcI857 (Spur 2), pcI857 (Spur 3) oder kein Plasmid (Spur 4) enthielt, nach Auftrennung in der 14-20% igen SDS-PAGE. Das Molekulargewicht (kd) der Proteinmarker sowie die Position von Protein-E (E) und des F'-Fusionsproteins (ΔF) sind angegeben.

B: Quantifizierung von Protein-E in E. coli DS410

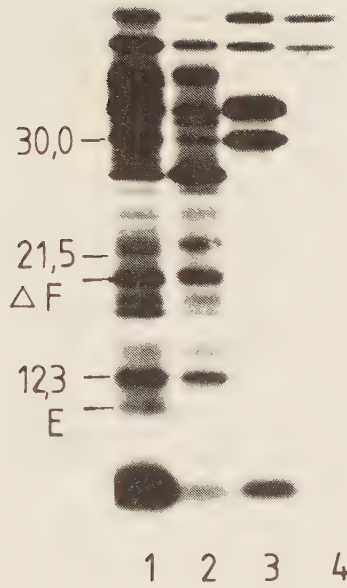
Das Densitogramm zeigt den Vergleich der Spuren 1 und 2 des Fluorogrammes von Abb.8A:

(IIII) Scan des Proteilmusters von DS410(pSB12,pcI857)

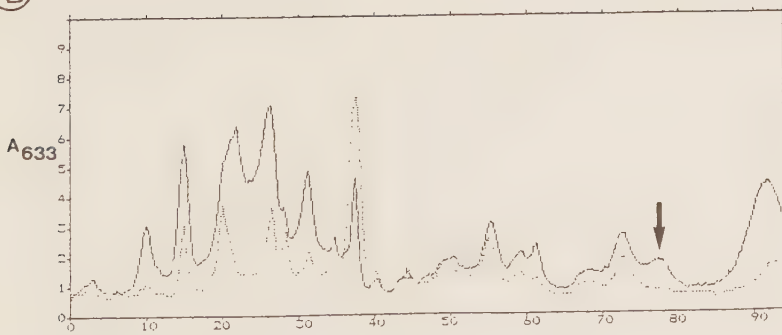
(....) Scan des Proteilmusters von DS410(pSB22,pcI857)

Die Position von Protein-E ist durch einen Pfeil wiedergegeben.

(A)



(B)



Zum eindeutigen Nachweis von Protein-E wurde das Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB22) oder von Minizellen, die entweder nur Plasmid pcI857 oder kein Plasmid trugen, als Vergleich herangezogen.

Im Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB12) konnte die Protein-E spezifische Bande eindeutig im Molekulargewichtsbereich von ungefähr 10 kD (Abb.8A: Spur 1) identifiziert werden. Die Molekulargewichtsposition stimmte mit der in Abbildung 7A gezeigten überein. Im Proteinmuster der Kontrollen (Abb.8A: Spur 2, 3 und 4) DS410(pcI857,pSB22), DS410(pcI857) und DS410 trat diese Proteinbande nicht auf.

Mit Hilfe der aufgetragenen Molekulargewichtstandarts konnte auch die Position des F'-Fusionsproteins in den Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB12) und DS410(pcI857,pSB22) festgelegt werden (Abb.8A: Spur 1 und 2).

Im Densitogramm des Proteinmusters von DS410(pcI857,pSB12) war Protein-E als deutlicher Peak im Gegensatz zum Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB22) sichtbar (Abb.8B). Die Quantifizierung von Protein-E wurde durch die gute Abtrennung von anderen Proteinen erleichtert. Der prozentuale Anteil von Protein-E am gesamt markierten Protein von DS410(pcI857,pSB12) betrug nach einer Markierungszeit von 45 Minuten nur 2,7%.

Die Klonierung einer Reihe verschiedener Gene, wie das β -Lactamase Gen (Remaut et al. 1981), das Tryptophan Synthetase A Gen (Remaut et al. 1981), das Phi29 p4 Gen (Mellado und Salas 1982) sowie das NusA Gen² unter die Transkriptionskontrolle von Lambda pL zeigte im Gegensatz zur Klonierung von Gen E, daß die entsprechenden Genprodukte unter induzierten Bedingungen einen Anteil von etwa 30% an der zellulären de novo Proteinsynthese aufwiesen. Es schien daher unwahrscheinlich, daß die schwache Protein-E Synthese in K12 Δ H1 Δ trp(pSB12) und in DS410(pcI857,pSB12) auf eine niedrige Transkription der Lambda pL nachgeschalteten Gene von Plasmid pSB12 zurückzuführen war. Daher ergaben die durchgeführten Gen E Expressionsstudien einen weiteren Hinweis auf eine translationale Kontrolle der Gen E Expression. Für eine translationale Expressionskontrolle von Gen E sprach auch der Lyseverlauf nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 und nach Gen E Expression von Plasmid pUH12 (Gen E unter der Kontrolle des lac Promotors). Nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 trat die Lyse nach 6 min ein (Abb.6), während der³ (Olins et al. 1983)

Lyseeintritt nach Expression von Plasmid pUH12 in E. coli Stämmen, die eine lac Repressorkonzentration von 3×10^3 bis 5×10^3 enthielten, nach 20-30 min erfolgte (Henrich 1983a). Die partielle Induktion des lac Promotors in E. coli lac Repressor Ueberproduzenten konnte daher nicht allein für die relativ schwache Gen E Expression von Plasmid pUH12 verantwortlich sein, da die Protein-E Synthese nicht über den Faktor der höheren Promotorstärke von Lambda pL (5-6 fach höher) gegenüber dem lac Promotor hinaus gesteigert werden konnte.

2. Translationseffizienz von Gen lacZ in Abhängigkeit von der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle

Der Homologiegrad der Ribosomenbindungsstelle auf der m-RNA (Shine und Dalgarno 1974) mit dem 3' Ende der 16s ribosomalen RNA der 30s Untereinheit beeinflusst die Stabilität (Dunn et al. 1978) des Initiationskomplexes der Translation und damit die Translationsinitiation selbst. Die Ribosomenbindungsstelle von Gen E umfasst die Nukleotide 555-558 der PhiX174 DNA Sequenz (Sanger et al. 1978) und weist in diesen 4 Nukleotiden Komplementarität mit dem 3' Ende der 16s ribosomalen RNA auf (Tab.3).

E	CTGCGTT <u>GAGG</u> CTTGCGTTT ATG
16S rRNA 3'Ende	3'HOAUUCCUCCACUA 5'
lacZ	TCACAC <u>AGGA</u> ACAGCT ATG

Tab.3: Vergleich der Gen E und lacZ spezifischen Ribosomenbindungsstelle

Die biologische Relevanz dieser PhiX174 DNA Sequenz für die Translationsinitiation von Gen E wurde durch zielgerichtete Mutagenese bestätigt (Gillam et al. 1984). Nach Basenaustausch von G in Position 557 der PhiX174 DNA Sequenz gegen A zeigten die künstlich hergestellten Phagenmutanten eine drastische Verzögerung der Lyserate. Als möglicher Kontrollfaktor der Gen E Expression auf Translationsebene sollte daher die "Stärke" der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle untersucht werden. Dazu wurde die Gen E spezifische Ribosomenbindungsstelle in 2 verschiedenen Ansätzen vor das an seinem 5' Ende deletierte lacZ Gen (Deletion der Codons 1-8) in den Vektor pMC1403 (Casadaban et al. 1980) kloniert. Plasmid pMC1403 trägt vor dem deletierten lacZ Gen weder ein Transkriptions- noch ein Translationsinitiationssignal. Um die PhiX174 nahe Translationsinitiationssituation zu erhalten, wurden sowohl "downstream" (3') als auch "upstream" (5') der Gen E Ribosomenbindungsstelle gelegene Sequenzen der PhiX174 DNA mitkloniert. Der Einfluß von 5' und 3' gelegener "Fremd-DNA Sequenzen" (Schottel et al. 1984; Stanssens et al. 1985) auf die Translationsinitiation von der Gen E spezifischen

Ribosomenbindungsstelle war somit unwahrscheinlich.

Um eine Aussage über die relative "Stärke" der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle treffen zu können, sollte die Translationseffizienz von Gen lacZ unter dem Gen E spezifischen Translationsinitiationssignal mit der Translationseffizienz unter seiner eigenen Ribosomenbindungsstelle (Tab.3) verglichen werden. Dazu wurden die lacZ spezifischen Kontrollsignale der Transkription und Translationsinitiation in dem Vektor pMC1403 rekonstituiert. Da der lac Promotor in allen Konstrukten vorgeschaltet wurde, ermöglichte diese Konstruktion den direkten Vergleich der Translationsinitiationsstärke der Ribosomenbindungsstellen von Gen E und Gen lacZ.

2.1. Konstruktion von Plasmid pSB85-1

Zur Rekonstitution der lacZ spezifischen Kontrollsignale in pMC1403 wurde ein 198er PvuII/BamHI Fragment (Abb.9A und 9B), das die lac Promotor-Operatorregion, die lacZ spezifische Shine-Dalgarno Sequenz und das Startcodon des lacZ Gens enthielt, aus Plasmid pUR222 (Rüther et al. 1981) isoliert.

Dieses PvuII/BamHI Fragment wurde in den mit SmaI und BamHI linearisierten Vektor pMC1403 ligiert (Abb.9A). Dies erlaubte die Erhaltung des Leserahmens von Gen lacZ. Nach der Transformation des Ligaseansatzes in E. coli MC1061 wurde auf X-Gal-Amp Platten selektioniert. Die β -Galaktosidase positiven Kolonien waren blau und enthielten Plasmid pSB85-1. Nach Isolation der Plasmid DNA aus mehreren blauen Kolonien wurde die Insertion des 198er PvuII/BamHI Fragmentes durch Restriktionskartierung bestätigt. Nach Verdau von pSB85-1 mit EcoRI und MstII (MstII schneidet 1x innerhalb der lacZ Gensequenz in Nukleotidposition 235 von Plasmid pMC1403) konnte das erwartete 428er Fragment nachgewiesen werden (Abb.11).

Abb.9: Konstruktion von Plasmid pSB85-1 und Nukleotidsequenz der transkriptionalen und translationalen Kontrollregion des lacZ Gens in Plasmid pSB85-1

A: Konstruktion von Plasmid pSB85-1

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB85-1 ist im Text beschrieben. Die lac Promotor-Operatorregion ist mit lacPO gekennzeichnet. Gen lacZ und Gen lacY sind durch die Buchstaben Z und Y symbolisiert. (☆) stellt die lacZ spezifische Shine-Dalgarno Sequenz dar. (☐) das Startcodon von lacZ.

Symbole für Restriktionsenzyme: △EcoRI; ●SmaI; ●BamHI;
■PvuII; □PstI; ▽TaqI;
◇AccI; ◇SalI; ⊙HindII;

Die Nukleotidsequenz der mit I bezeichneten DNA Region von Plasmid pSB85-1 ist in Abb.9B wiedergegeben.

B: Nukleotidsequenz der lacZ Kontrollregion in pSB85-1

Die Nukleotidsequenz wurde zusammengestellt aus Daten von Dickson et al. 1975; Farabough 1978; Casadaban et al. 1980; Rüther et al. 1981; Kalmins et al. 1983; Der m-RNA Start, die PvuII (■) und BamHI (●) Schnittstellen (Text) sind eingezeichnet. Codogene Sequenzen sind in Tripletts dargestellt. Die eingerahmten Sequenzen entsprechen der lacZ spezifischen Shine-Dalgarno Sequenz (☆) sowie dem Startcodon des lacZ Gens. Die unterstrichenen Codons sind nicht lacZ spezifisch. Codon 9-1023 entspricht der original Sequenz des lacZ Gens.

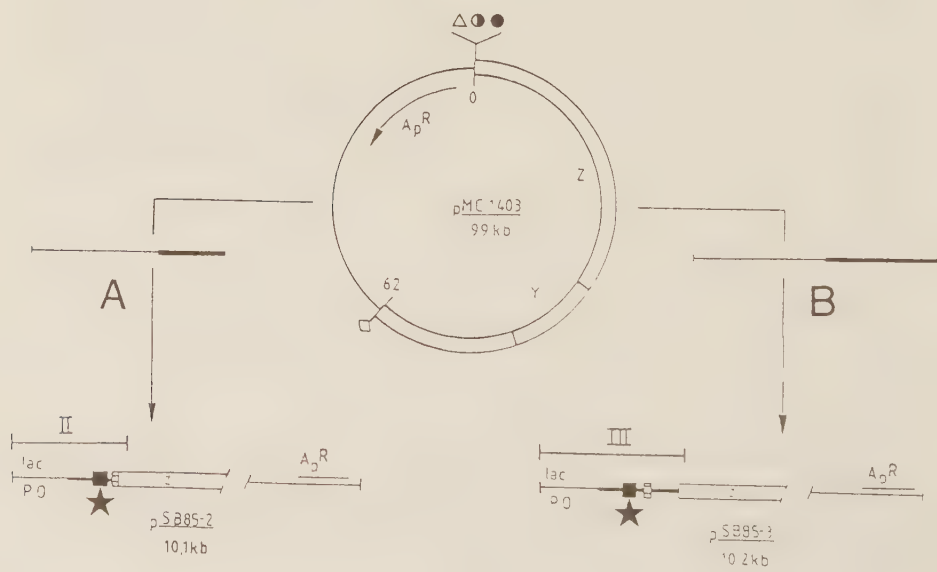
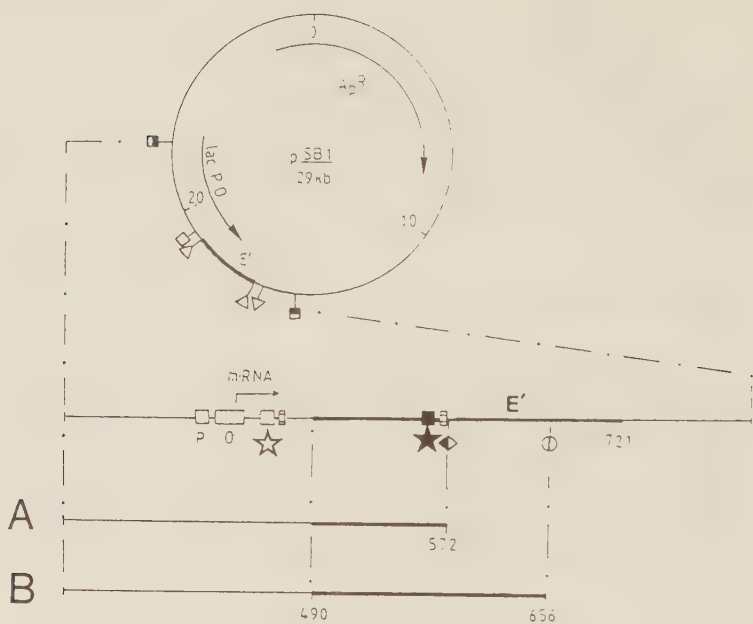
2.2. Konstruktion der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3

Die Restriktionsfragmente zur Klonierung der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle mit "upstream" oder "up- und downstream" Sequenzen der PhiX174 DNA wurden aus Plasmid pSB1 isoliert. Die Konstruktion von Plasmid pSB1 ist in Abbildung 31 dargestellt. Plasmid pSB1 enthält die ersten 51 Codons von Gen E (PhiX174 Sequenz von Nukleotid 490-721). Der Konstruktionsweg der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3 ist in Abbildung 10A gezeigt.

Nach PvuII Verdau von Plasmid pSB1 wurde zunächst ein 526er Fragment isoliert, das anschließend mit RsaI (Abb.10A: Fragment A: 271 bp) oder mit HindII (Abb.10A: Fragment B: 355 bp) nachverdaut wurde. Beide Fragmente enthielten die lac Promotor-Operatorregion, die Shine-Dalgarno Sequenz und das Startcodon von Gen lacZ sowie die Shine-Dalgarno Sequenz und das Startcodon von Gen E (Abb.10B).

Durch die Auswahl der RsaI (Fragment A) und HindII (Fragment B) Schnittstellen sowie durch Klonierung in die EcoRI Schnittstelle von Plasmid pMC1403, die aufgefüllt wurde, war auch in diesen Konstrukten die Erhaltung des lacZ Gen spezifischen Leserahmens (Abb.10B) möglich.

(A)



(B)

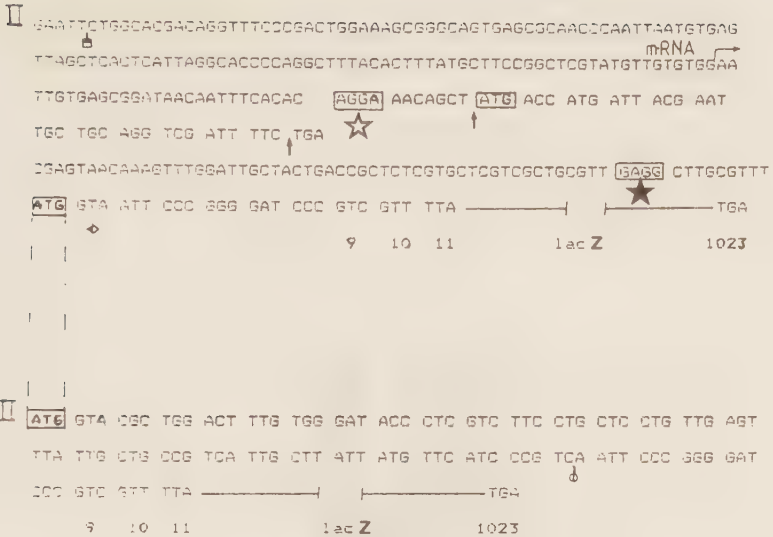


Abb.10: Konstruktion der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3 und Nukleotidsequenz der transkriptionalen und translationalen Kontrollregionen vor Gen lacZ in den Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3

A: Konstruktion der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3
 Der Konstruktionsweg der Plasmide ist im Text beschrieben. Die lac Promotor und Operatorregion ist mit lacPO bezeichnet. Gen lacZ und Gen lacY sind durch die Buchstaben Z und Y dargestellt. (★) stellt die lacZ Gen spezifische, (★) die Gen E spezifische Shine-Dalgarno Sequenz und (■) das jeweilige Startcodon von Gen E oder Gen lacZ dar. Die Zahlen unterhalb der klonierten Fragmente geben die entsprechenden Nukleotidpositionen innerhalb der PhiX174 DNA an.

Symbole für Restriktionsenzyme: □PvuII; □PstI; ▼TaqI; △EcoRI;
 ○HindII; ◆RsaI; ●BamHI; ●SmaI;
 ◇SalI;

Die Nukleotidsequenzen der mit II und III gekennzeichneten DNA Regionen der Plasmide pSB85-2 und pSB85-3 sind in Abb.10B dargestellt.

B: Nukleotidsequenz der Kontrollregionen vor Gen lacZ in den Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3
 Die Nukleotidsequenz wurde aus Daten von Dickson et al. 1975; Farabough 1978; Casadaban et al. 1980; Ruther et al. 1981; und Kalmins et al. 1983; zusammengestellt. Codogene Sequenzen sind in Triplets wiedergegeben. Codon 9-1023 entspricht der original Sequenz des lacZ Gens. Die lacZ spezifische Shine-Dalgarno Sequenz und Startcodon ermöglichen die Translation eines Fusionspeptides zwischen lacZ und PhiX174 DNA Sequenzen. Der translatierte Bereich dieses Peptides umfasst den mit Pfeilen markierten Bereich (II).

II: pSB85-2

m-RNA Start, sowie die PvuII und RsaI Schnittstellen sind eingezeichnet. Die eingerahmten Sequenzen entsprechen der lacZ spezifischen (★) und der Gen E spezifischen Shine-Dalgarno Sequenz (★) und den zugehörigen Startcodons.

III: pSB85-3

Von pSB85-3 ist nur der "downstream" des Gen E Startcodons (eingerahmt) gelegene Bereich, sowie die HindII Schnittstelle angegeben. "Upstream" des Startcodons gelegene Sequenzen sind den unter II dargestellten analog.

Nach Ligation und Transformation der beiden Ligaseansätze in *E. coli* MC1061 wurde auf X-Gal-Amp Platten selektioniert. Die Analyse der Plasmid DNA einiger blauer Kolonien mit *EcoRI* (*EcoRI* Schnittstelle bleibt nach "blunt end" Ligierung mit der *PvuII* Schnittstelle der klonierten Fragmente in beiden Konstrukten erhalten) und *MstII* bestätigte die gesuchte Orientierung der Fragmente (Abb.10A) in den rekombinanten Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3.

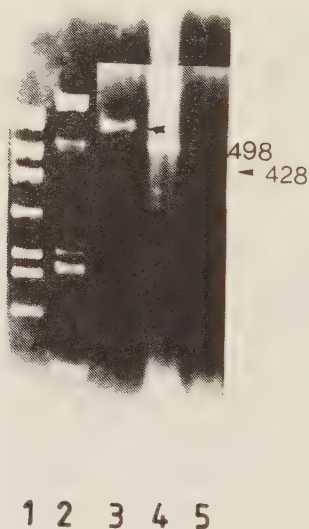


Abb.11: Restriktionsanalyse der Plasmide pSB85-1, pSB85-2 und pSB85-3

Die Plasmide pSB85-1, pSB85-2 und pSB85-3 wurden mit *EcoRI* und *MstII* verdaut und in einem 6% PAA-Gel aufgetrennt. Als Marker sind in Spur 1 mit *HaeIII* verdaute pUR222 DNA mit den Fragmenten 587; 457; 434; 338; 267; 230; 188; 102; und 80 und in Spur 2 mit *AluI* verdaute pUR222 DNA mit den Fragmenten 692; 520; 269; 257; 226; 136; 135; 100; und 95 aufgetragen. Die angegebenen Fragmentgrößen in Spur 3 (pSB85-3), Spur 4 (pSB85-2) und Spur 5 (pSB85-1) zeigen die *EcoRI/MstII* Fragmente der betreffenden Plasmide (Text).

Die errechneten Restriktionsfragmente von 498 Nukleotiden (pSB85-2) und 582 Nukleotiden (pSB85-3) konnten nachgewiesen (Abb.11) werden.

Die auf beiden klonierten Fragmenten (Abb.10B) vorhandenen Translationsinitiationssignale von Gen lacZ sollten auf die Expression der β -Galaktosidase in den Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3 keine Auswirkung haben, da von dieser Ribosomenbindungsstelle nur ein kurzes Fusionspeptid synthetisiert (Abb.10B) werden kann.

2.3. Quantifizierung und Proteinnachweis von β -Galaktosidase nach Expression des lacZ Gens von den Plasmiden pSB85-1, pSB85-2 und pSB85-3

Zur Bestimmung der Translationseffizienz von Gen lacZ in Abhängigkeit von der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle wurden E. coli MC1061(pSB85-1), MC1061(pSB85-2) und MC1061(pSB85-3) mit einer OD 600 von 0,05 angeimpft und bis zur OD 600 von 0,8 bei 37 C gezogen. Anschließend wurden die Zellen mit Lysozym/EDTA aufgeschlossen und die β -Galaktosidase Aktivitäten im jeweiligen Gesamtzellextrakt bestimmt. Zur β -Galaktosidasemessung wurden mehrere Proben pro Ansatz verwendet. Die Durchschnittswerte aller Messungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die β -Galaktosidaseaktivität nach Expression von Plasmid pSB85-1 wurde gleich 100% gesetzt. In Relation dazu betrug die gemessene β -Galaktosidaseaktivität nach Expression von den Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3 nur 2% bzw. 6%.

Plasmid	units	%
pSB85-1	6052 +/- 121	100
pSB85-2	124 +/- 8	2
pSB85-3	366 +/- 7	6
pMC1403	27 +/- 5	0,4

Tab.4: Messung der β -Galaktosidaseaktivitäten in E. coli MC1061(pSB85-1), MC1061(pSB85-2) und MC1061(pSB85-3)

Durch gelelektrophoretische Analyse der Proteinmuster von MC1061(pSB85-1), MC1061(pSB85-2) und MC1061(pSB85-3) wurden die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten (Tab.4) zusätzlich mit der jeweils synthetisierten Menge an β -Galaktosidase auf Proteinebene verglichen.

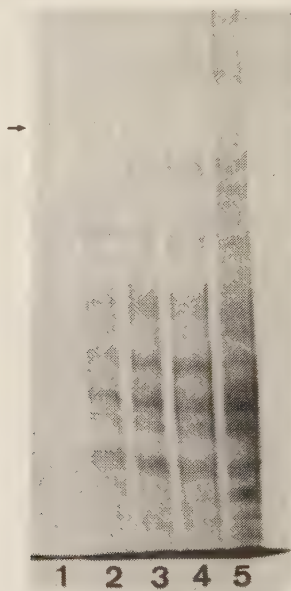


Abb.12: Synthese von β -Galaktosidase von den Plasmiden pSB85-1, pSB85-2, pSB85-3 und pMC1403 in *E. coli* MC1061

Pro Spur wurden 100 μ g Gesamtzellprotein von Zellen gleicher Wachstumsphase aufgetragen und auf einem 7,5% PAA-Gel analysiert.
Spur 1: β -Galaktosidase (käufliche Probe)
Spur 2: MC1061(pSB85-1)
Spur 3: MC1061(pSB85-3)
Spur 4: MC1061(pSB85-2)
Spur 5: MC1061(pMC1403)

Dazu wurden identische Proteinkonzentrationen von Zellen, die in der gleichen Wachstumsphase geerntet wurden, auf einem 7,5% PAA-Gel analysiert (Abb.12).

Im Proteinmuster von MC1061(pSB85-1) (Spur 2) war β -Galaktosidase als Hauptproteinbande erkennbar. Dagegen konnte das von Plasmid

pSB85-3 exprimierte E'- β -Gal-Fusionsprotein (Abb.10B) und die von Plasmid pSB85-2 exprimierte β -Galaktosidase nach Coomassie Färbung im Proteilmuster von MC1061(pSB85-3) (Spur 3) bzw. MC1061(pSB85-2) (Spur 4) nicht nachgewiesen werden. Die gemessenen niedrigen β -Galaktosidaseaktivitäten in E. coli MC1061(pSB85-2) und MC1061(pSB85-3) (Tab.4) beruhen demnach tatsächlich auf einer geringen β -Galaktosidase Synthese und sind zum Beispiel nicht auf den Protein-E Anteil in dem Plasmid pSB85-3 kodierten E'- β -Gal-Fusionsprotein zurückzuführen.

Da Gen lacZ in den Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3 unter der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle translatiert wurde, ließ die Quantifizierung der β -Galaktosidasemoleküle pro Zelle zugleich eine indirekte Aussage über die Anzahl von Protein-E Molekülen pro Zelle zu. Die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten (Tab.4) konnten darüber hinaus direkt mit der Expression von Gen E von Plasmid pUH12 (Henrich et al. 1982a) in Beziehung gesetzt werden. Die Gen E Expression unterliegt in Plasmid pUH12 den gleichen Kontrollsignalen der Transkription (lac Promotor) und Translation (Gen E Ribosomenbindungsstelle) als die lacZ Gen Expression in den Plasmiden pSB85-2 und pSB85-3. Die Berechnung der β -Galaktosidase Moleküle pro Zelle erfolgte nach der Formel:

$$\beta\text{-Gal Molek.}/\text{Zelle} = \text{units/ml} \times X/Y$$

X = β -Gal Molek./unit (= 7×10^9 ; Maratea et al. 1985)

Y = cfu/ml bei OD 600 von 0,8

Für die Expression von Plasmid pSB85-3 ergab die Berechnung 5124, für die Expression von Plasmid pSB85-2 1736 Moleküle

β -Galaktosidase pro Zelle bei OD 600 von 0,8. Zum Wachstum von OD 600 von 0,05 bis zur OD 600 von 0,8 benötigten die Zellkulturen von MC1061(pSB85-3) und MC1061(pSB85-2) 128 bzw. 132 Minuten.

Nach Gen E Expression von Plasmid pUH12 trat die Lyse in E. coli Stämmen, die eine lac Repressorkonzentration zwischen 3×10^3 und 5×10^3 Repressormolekülen pro Zelle aufwiesen, nach 20-30 Minuten ein (Henrich 1983a). Berücksichtigt man die nach Expression von den Plasmiden pSB85-3 und pSB85-2 innerhalb von 20 bzw. 30 Minuten gebildeten β -Galaktosidase Moleküle pro Zelle, so läßt sich die kritische Protein-E Konzentration zum Zeitpunkt des Lyseeintritts mit einem Wert, der zwischen 263 und 1202 Molekülen liegt, berechnen.

Möglicherweise kann Protein-E aufgrund seines niedrigeren Molekulargewichtes gegenüber β -Galaktosidase schneller

synthetisiert werden. Dennoch bestätigte diese grobe Abschätzung die in bisherigen Studien ermittelte geringe Zahl von Protein-E Molekülen pro Zelle (Pollock et al. 1978; Maratea et al. 1985). Diese Untersuchungen zur Translationseffizienz von Gen lacZ in Abhängigkeit von der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle zeigten, daß Gen E gegenüber Gen lacZ ein relativ schwaches Translationsinitiationssignal besitzt. Die schwache Translationsinitiation trägt vermutlich wesentlich zur translationalen Expressionskontrolle von Gen E bei.

2.4. Sekundärstrukturuntersuchungen der Lambda pL spezifischen m-RNA von Plasmid pSB12 und der PhiX174 spezifischen m-RNA Spezies XIII

Untersuchungen über intramolekulare Basenpaarungen der PhiX174 Einzelstrang-DNA (Edlund und Ihler 1980) ergaben, daß das Gen E Startcodon innerhalb einer gepaarten Sequenz liegt. Die Autoren hielten daher die Zugänglichkeit der Gen E Ribosomenbindungsstelle für Ribosomen nur auf solchen PhiX174 m-RNA Transkripten für möglich, denen diese gepaarten Sequenzen fehlen (Edlund und Ihler 1980).

Um zu überprüfen, ob die schwache Translationsinitiation von Gen E auf der Maskierung der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle infolge Ausbildung lokaler m-RNA Sekundärstrukturen beruht, wurden die Sekundärstrukturen der

Abb.13: Untersuchung der Sekundärstruktur der Lambda pL spezifischen m-RNA von Plasmid pSB12

A: Organisation der Lambda pL spezifischen m-RNA

Der große Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung von Lambda pL (pL) in Plasmid pSB12 an. PhiX174 Gene sind durch Buchstaben symbolisiert. TJ bezeichnet den Terminator hinter Gen J. Das 663 Nukleotide lange Transkript von pL bis TJ ist durch einen Pfeil dargestellt. Die Nukleotidsequenz von 1-118 auf dem Transkript ergibt sich aus der Lambda pL Region von Plasmid pSB12. Die Nukleotide 119 und 663 auf dem Transkript entsprechen den Nukleotiden 447 bzw. 991 auf der PhiX174 DNA.

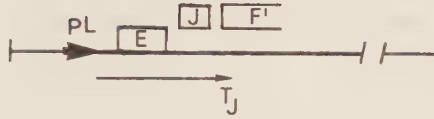
B: Nukleotidsequenz der Lambda pL spezifischen m-RNA

Die Shine-Dalgarno Sequenz und das Startcodon von Gen E sind eingerahmt. Die Pfeile geben den m-RNA Start von Lambda pL (pL) und das Stoppcodon von Gen E (E) an.

C: Mögliche intramolekulare Basenpaarung der Ribosomenbindungsstelle von Gen E mit Sequenzen auf dem Transkript

Die Shine-Dalgarno Sequenz von Gen E ist eingerahmt.

(A)



(B)

PL →	AUCAGCAGGA	10	CGCACUGACC	20	ACCAUGAAGG	30	UGACGCUCUU	40	AAAAUUAAGC	50	CCUGAAGAAG	60
	GGCAGCAUUC	70	AAAGCAGAAG	80	GCUUUGGGGU	90	GUGUGAUACG	100	AAACGAAGCA	110	UUGGAAUUCU	120
	CAUUCAGGCU	130	UCUGCCGUUU	140	UGGAUUUAAC	150	CGAAGAUGAU	160	UUCGAUUUUC	170	UGACGAGUAA	180
	CAAGUUUUGG	190	AUUGCUACUG	200	ACCGCUCUCG	210	UGCUCGUCGC	220	UGCGUUGAGG	230	CUUGCGUUUE	240
	UGUAACGCGU	250	GACUUUGUGG	260	GAUACCCUCG	270	CUUCCUGUCU	280	CCUGUUGAGU	290	UUAUUGCUGC	300
	CGUCAUUGCU	310	UAUUAUGUUC	320	AUCCCGUCAA	330	CAUUCAAACG	340	GCCUGUCUCA	350	UCAUGGAAGG	360
	CGCUGAAUUU	370	ACGGAUUAAC	380	UUUAUUAUGG	390	CGUCGAGCGU	400	CCGGUUAUAA	410	CGGCUGAUUU	420
	GUUCGCGUUU	430	ACCUUGCGUG	440	UACGCGCAGG	450	AAACACUGAC	460	GUUCUUUACU	470	ACGCAGAAGA	480
	AAACGUGCGU	490	CAAAAAUUAC	500	GUGCGGAAGG	510	AGUGAUGUAA	520	UGUCUAAAGG	530	UAAAAACGU	540
	UCUGGCGCUC	550	GCCCUGGUCG	560	UCCGCGAGCG	570	UUGCGAGGUA	580	CUAAAGGCAA	590	GCGUAAAGGC	600
	GCUCGUCUUU	610	GGUAUGUAGG	620	UGGUCAACAA	630	UUUUAAUUGC	640	AGGGGCUUCG	650	GCCCCUUAUCU	660

UGA

(C)

STACKING ENERGY = -15.40
 125 CAGGCUUC
 * : * * : *
 134 GUUCGGAGG

Lambda pL spezifischen m-RNA von Plasmid pSB12 (Abb.3) und der PhiX174 m-RNA Spezies XIII (Abb.2) untersucht.

Ausgehend von Lambda pL ist von Plasmid pSB12 die Synthese einer 663 Nukleotide langen m-RNA möglich (Abb.13B). Diese wird am PhiX174 spezifischen Terminator J beendet (Abb.13A). Die Sekundärstrukturanalyse des Transkriptes zeigte, daß für die Shine-Dalgarno Sequenz von Gen E (Position 227-230 auf dem Transkript) 1 Paarung mit der Region 129-132 auf dem Transkript möglich ist (Abb.13C). Die Gesamtheit aller möglichen intramolekularen Basenpaarungen auf dem 663er Transkript ist im Anhang (2.) dargestellt.

Von den 10 in vivo transkribierten m-RNA's von PhiX174 (Hayashi et al. 1976), von denen jede für Gen E codiert, wurde die m-RNA Spezies XIII (Abb.2) zur Sekundärstrukturanalyse aus folgenden Gründen ausgewählt. Die m-RNA XIII tritt nach PhiX174 Infektion zusammen mit der m-RNA IX (Abb.2) am häufigsten auf und ist mit einer Halbwertszeit von 8,1 Minuten funktionell und strukturell stabil (Hayashi und Hayashi 1981). Für die Translation von Gen E ist die m-RNA XIII daher mit am wichtigsten (Hayashi und Hayashi 1981). Die Synthese dieser 634 Nukleotide langen m-RNA (Abb.14A) startet auf der PhiX174 RF1-DNA am D Promotor und wird am Terminator J beendet (Abb.2). Die Sekundärstrukturanalyse der m-RNA XIII ergab für die Shine-Dalgarno Sequenz von Gen E (Position 198-201 auf dem Transkript) 2 mögliche Paarungen (Abb.14B).

- Paarung mit den Nukleotiden 100-103 auf dem Transkript
 - Paarung mit den Nukleotiden 617-620 auf dem Transkript
- Alle anderen möglichen intramolekularen Paarungen auf dem Transkript sind im Anhang (3.) wiedergegeben.

Die Sekundärstrukturanalysen der Lambda pL spezifischen m-RNA von Plasmid pSB12 und der PhiX174 spezifischen m-RNA XIII zeigten, daß für die Gen E spezifische Ribosomenbindungsstelle auf beiden Transkripten keine Basenpaarungen mit Nachbarschaftsnukleotiden möglich sind. Daher ist die beobachtete "loop" Größe der möglichen "hairpin" Strukturen, die sich auf den beiden untersuchten m-RNA's durch die dargestellten Basenpaarungen (Abb.13C und 14B) ergeben, sehr groß. In perfekten "hairpin" Strukturen beinhaltet der "loop" zwischen 3 und 20 Nukleotide und die gepaarten intramolekularen Bereiche sollen keine G-U Paarungen aufweisen (Müller und Fitch 1982).

(A)

PD

```

GAUGCUGUUC 10 AACCACUAAU 20 AGGUAAGAAA 30 UCAUGAGUCA 40 AGUUAUGUAA 50 CAUCCGUAC 60
UUUUCAGAG 70 CGCUUUGGCC 80 UCUUUUAGC 90 UCAUUCAGGC 100 UUCUGCCGUU 110 UUGGAUUUAA 120
CCGAAGAUCA 130 UUUUGAUUUU 140 CUGACGAGUA 150 ACAAGUUUG 160 GAUUGCUACU 170 GACCGCUCUC 180
GUGGUGUG 190 GUGGUGUG 200 E 210 AUGGUAUGCU 220 GGACUUUGUG 230 GGAUACCCUC 240
GCUUUCUGUC 250 UCCUGUUGAG 260 UUUUUUGCUG 270 CGGUAUUGC 280 UUUUUUGU 290 CAUCCGUAC 300
ACAUUCAAAC 310 GCGCUGUCUC 320 AUCAUGGAAG 330 GCGCUGAAU 340 UACGGAAUAC 350 AUUUUUUAG 360
GCGUGAGGCG 370 UCCGUGUAAA 380 GCGGUGAAU 390 UGUUCGCGU 400 UACCUUGCGU 410 GUACCGCGAG 420
GAAACACUGA 430 GGUUCUUAU 440 GACGAGAAAG 450 AAAACGUGCG 460 UCAAAAUAU 470 CGUGCGGAAG 480
E↓ 490 AUGUCUAAAG 500 GUAAAAACG 510 UUCUGGCGU 520 CGCCUGGUC 530 GUCCGAGCG 540
GUUGCGAGGU 550 ACUAAAGGA 560 AGCGUAAAG 570 CGCUGGUGU 580 UGGUAUGUAG 590 GUGGUACAAC 600
AUUUUUUUG 610 CAGGGGCUUC 620 GGGCCCUUAC 630 UUGA

```

(B)

STACKING ENERGY = -16,0

STACKING ENERGY = -15,0

96 CAGGCUUC

*: *: *: *

205 GUUCGGAG

195 GUGGAGGCUU

* *: *: *

623 CGGCUUCGGG

Abb.14: Untersuchung der Sekundärstruktur der PhiX174 m-RNA Spezies XIII

A: Nukleotidsequenz der m-RNA XIII

Das 634 Nukleotide lange Transkript startet auf der PhiX174 DNA am D Promotor (Nukleotid 357 auf der PhiX174 DNA) und wird am Terminator hinter Gen J (Nukleotid 991 auf der PhiX174 DNA) beendet. Die Shine-Dalgarno Sequenz und das Startcodon von Gen E sind eingerahmt. Die Pfeile geben den Transkriptionsstart vom PhiX174 D Promotor (PD) und das Stoppcodon von Gen E an.

B: Mögliche intramolekulare Basenpaarungen der Ribosomenbindungsstelle von Gen E mit Sequenzen auf dem Transkript

Die Shine-Dalgarno Sequenz von Gen E ist eingerahmt.

Es ist daher fraglich, ob die festgestellten Paarungen der Shine-Dalgarno Sequenz von Gen E auf den beiden m-RNA's (Abb.13C und 14B) aufgrund ihrer "loop" Größe und der mit einbezogenen G-U Paarungen überhaupt biologische Relevanz besitzen.

Die Sekundärstrukturanalysen der beiden m-RNA's lieferten somit keinen Hinweis für eine "hairpin" Struktur im Bereich der Gen E Ribosomenbindungsstelle, welche die beschriebene schwache Gen E Translationsinitiation erklären könnte.

3. Einfluß der Gen D Expression auf die Translations-effizienz von Protein-E

Gen E liegt vollständig innerhalb der Gen D Sequenz (Abb.1) und kommt ebenso wie Gen E auf allen PhiX174 spezifischen m-RNA Spezies vor (Abb.2). Gen D startet bei Nukleotid 390 auf der PhiX174 DNA und endet bei Nukleotid 848. Innerhalb dieser Sequenz liegt Gen E zwischen Nukleotid 568 und 843 und wird mit +1 Leserasterverschiebung zu Gen D translatiert (Sanger et al. 1978). In PhiX174 infizierten Zellen wird Gen D mit mindestens 10 fach höherer Effizienz als Gen E exprimiert (Pollock et al. 1978). Es war denkbar, daß die hohe simultane Translation des unterliegenden Gen D die Zugänglichkeit der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle für Ribosomen beeinträchtigt und damit die Translationsinitiation von Gen E herabsetzt. In diesem Fall wäre die Expression der beiden Überlappenden Gene D und E translational gekoppelt. Dieser Mechanismus könnte zusätzlich zur schwachen Ribosomenbindungsstelle von Gen E zur Kontrolle der Gen E Expression auf translationaler Ebene beitragen und die schwache Protein-E Synthese in PhiX174 infizierten Zellen (Pollock et al. 1978) erklären. Zur Ueberprüfung dieser Hypothese wurden die PhiX174 Gene D und E gemeinsam der Kontrolle von Lambda pL unterstellt und der Einfluß der Gen D Kotranslation auf die Gen E Expression untersucht.

3.1. Konstruktion von Plasmid pSB35

Die Klonierung der Gene D und E unter die Kontrolle von Lambda pL ist in Abbildung 15 dargestellt. Alle folgenden Angaben zu Fragmentgrößen und Restriktionsschnittstellen beziehen sich auf die Sequenzierungsdaten von Sanger und Mitarbeiter (Sanger et al. 1978).

Der Verdau der PhiX174 RF DNA mit HpaI lieferte 3 Fragmente mit einer Größe von 3730 bp, 1264 bp und 392 bp. Das 1264er Fragment (entspricht Nukleotid 31-1294 der PhiX174 DNA), das die vollständigen PhiX174 Gene C, D, E, J und K sowie einen Teil des F Genes trägt (Abb.15), wurde isoliert und anschließend mit SfaNI nachverdaut. Dieses Enzym wurde gewählt, da es das 1264er Fragment hinter Nukleotid 367 der PhiX174 DNA spaltet. Dadurch wurde der vor Gen D gelegene D-Promotor (m-RNA Start: Nukleotid 357 auf der PhiX174 DNA) auf dem zur weiteren Klonierung

Abb.15: Konstruktion von Plasmid pSB35

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB35 ist im Text beschrieben. Die PhiX174 Gene sind mit Buchstaben bezeichnet. PD gibt den D Promotor von PhiX174 an. Die Skala unterhalb, der entsprechend ihrem Leseraster eingezeichneten PhiX174 Gene gibt die Position der Gene auf der Genkarte von PhiX174 in kb an. Der offene Balken in Plasmid pSB35 repräsentiert PhiX174 DNA. Die Transkriptionsrichtung von Lambda pL (►) ist durch einen Pfeil dargestellt. Die Plasmidkarten sind in Abschnitte von 1000 bp unterteilt. Die am Anfang und Ende der jeweiligen Fragmente befindlichen Zahlen geben die Positionen auf der PhiX174 Genkarte an. Symbole für Restriktionsenzyme:

△EcoRI; ▽TaqI; ●BamHI; ⊙HindIII; ⊙BclI; ⊙HindII; ◆SfaNI; ◇HpaI;

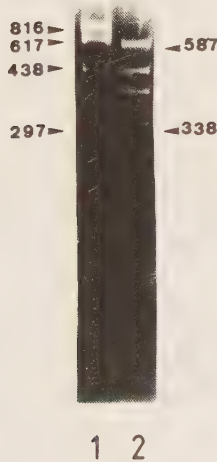


Abb.16: Restriktionskartierung von Plasmid pSB35 mit HindII

Die HindII Schnittstellen von Plasmid pSB35 sind in Abb.15 angegeben. Plasmid pSB35 (Spur 1) wurde mit HindII gespalten und die Fragmente in einem 6% PAA-Gel aufgetrennt. Als Marker ist mit HaeIII verdaute pUR222 DNA (Spur 2) mit den Fragmentgrößen 587; 457; 434; 338; 267; 230; 188; 102; und 80 aufgetragen. Die nach Spaltung von Plasmid pSB35 mit HindII gefundenen Fragmentgrößen (3256; 816; 617; 438; 297;) sind angegeben. Sie stimmten mit den aus der Literatur berechneten überein und bestätigten die in Abb.15 dargestellte Orientierung der Gene D und E zu Lambda pL.

verwendeten 927er Fragment entfernt. Erst durch die Entfernung des PhiX174 D-Promotors war die gemeinsame Klonierung der Gene D und E möglich, da die letale Gen E Funktion damit der Kontrolle des Lambda pL unterstellt und kontrolliert exprimiert werden konnte. Nach Isolierung des 927er Fragmentes, das die PhiX174 Gene D, E, J und einen Teil des F Genes (F') trägt, wurden die überstehenden Enden aufgefüllt. Danach erfolgte die Ligation des Fragmentes in Plasmid pLc236 (Remaut et al. 1981), das zuvor mit EcoRI linearisiert und ebenfalls aufgefüllt worden war. Der Ligaseansatz wurde in *E. coli* pop2135 transformiert. Nach Plasmid DNA Isolation von Amp resistenten Klonen wurde nach Plasmiden gesucht, die nach gelelektrophoretischer Analyse gegenüber dem Ausgangsvektor pLc236 ein höheres Molekulargewicht aufwiesen. Die gesuchte Orientierung (Gen D mit seinem 5' Ende zum Lambda pL orientiert) des 927er Fragmentes zum Lambda pL Promotor wurde durch Restriktionskartierung des rekombinanten Plasmides pSB35 mit HindIII (Abb.16) und durch den physiologischen Lysetest (Abb.17) bestätigt.

3.2. Lyse von *E. coli* nach Expression der Gene D und E von Plasmid pSB35

Um den Einfluß der Gen D Kotranslation auf die Translationseffizienz von Gen E nach Expression beider Gene von Plasmid pSB35 zu untersuchen, wurde die Gen E Expression von Plasmid pSB12 als Kontrolle herangezogen. Der direkte Vergleich der Gen E Expression von Plasmid pSB12 mit Plasmid pSB35 war einerseits durchführbar, da die klonierten PhiX174 Gene in beiden Plasmiden der Kontrolle von Lambda pL unterliegen und somit gleich stark transkribiert werden. Andererseits stellen beide Plasmide ein Derivat von Plasmid pLc236 dar und weisen deshalb gleiche Kopienzahl pro Zelle auf. Der einzig signifikante Unterschied der Plasmide pSB12 und pSB35 beruht nur auf dem in Plasmid pSB35 klonierten Gen D. Daher sollte verändertes Lyseverhalten von *E. coli* nach Induktion der Lambda pL nachgeschalteten Gene von Plasmid pSB35 gegenüber Plasmid pSB12 nur auf die simultane Gen D Translation von Plasmid pSB35 zurückzuführen sein.

Nach Induktion von Lambda pL wurden der Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Lyserate, die ein Maß für die Protein-E Synthese pro Zeiteinheit darstellen, von

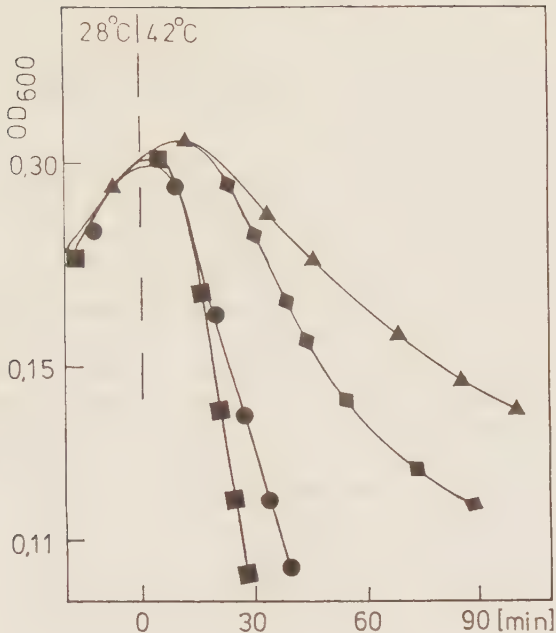


Abb.17: Vergleich der Protein-E Lyse nach simultaner Expression der Gene D und E von Plasmid pSB35 mit der Protein-E Lyse nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 in *E. coli* K12ΔHIΔtrp und pop2135

E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB12) (■-■), K12ΔHIΔtrp(pSB35) (●-●), pop2135(pSB12) (◆-◆) und pop2135(pSB35) (▲-▲) wurden in LB-Medium unter selektiven Bedingungen bei 28 C angezogen. Bei OD 600 von 0,3 (unterbrochene Linie) erfolgte Temperaturerhöhung von 28 C auf 42 C und damit Expression der Lambda pL nachgeschalteten Gene.

E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB12) und K12ΔHIΔtrp(pSB35) sowie von *E. coli* pop2135(pSB12) und pop2135(pSB35) verglichen (Abb.17). Der Zeitpunkt des Lyseeintritts war nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 und Plasmid pSB35 in beiden untersuchten *E. coli* Stämmen identisch (Abb.17). Die Lyse trat in K12ΔHIΔtrp(pSB12) und K12ΔHIΔtrp(pSB35) 7 min nach Temperaturerhöhung (bei OD 600 von 0,3) auf 42 C ein. In pop2135(pSB12) und pop2135(pSB35) begann der Lyseeintritt unter den gleichen Bedingungen nach jeweils 13 Minuten. Die kritische Menge an Protein-E, die zur

Initiation der Zellyse ausreicht, wurde somit nach Expression von Plasmid pSB12 als auch nach Expression von Plasmid pSB35 gleichschnell synthetisiert.

Im weiteren Lyseverlauf zeigte die Gen D Kotranslation in beiden Stämmen einen leichten Einfluß auf die Lyserate und damit auf die Protein-E Synthese. In *E. coli* pop2135(pSB35) war die Lyserate gegenüber pop2135(pSB12) stärker verzögert als in K12ΔH1Δtrp(pSB35) gegenüber K12ΔH1Δtrp(pSB12) (Abb.17).

Die schwache Auswirkung der Gen D Kotranslation auf die Protein-E Synthese hatte aber keinen meßbaren Einfluß auf den Lyseeintritt und wurde erst im späteren Lyseverlauf deutlich. Die Trägheit des verwendeten Meßverfahrens (Lysetest) reichte vermutlich nicht aus, um den geringen Zeitunterschied des Lyseeintritts von Plasmid pSB12 Rezipienten gegenüber Plasmid pSB35 Rezipienten sichtbar zu machen. Dies bedeutet aber gleichzeitig, daß die zum Lyseeintritt notwendige Menge an Protein-E sehr niedrig ist. Würde dagegen eine hohe Anzahl von Protein-E Molekülen zur Initiation der Zellyse benötigt, so könnte auch der beobachtete schwache Einfluß der Gen D Kotranslation den Zeitpunkt der Protein-E Lyse meßbar verzögern.

3.3. Nachweis der plasmidcodierten Proteine von Plasmid pSB35

Die von den Plasmiden pSB12 und pSB35 exprimierten Mengen an Protein-E wurden in Minizellen quantifiziert.

3.3.1. Sequenzanalyse von Plasmid pSB35

Zur leichteren Identifikation der in Minizellen exprimierten Proteine wurden die Sequenzdaten von Plasmid pSB35 zusammengestellt.

Das unter der Kontrolle von Lambda pL in Plasmid pSB35 klonierte 927er PhiX174 Fragment trägt 3 intakte Gene: D, E und J (Abb.15). Wie von Plasmid pSB12, so wird auch von Plasmid pSB35 ein Fusionsprotein exprimiert, das durch den F-Gen Anteil (F') von PhiX174 und der tet Gen Region des Klonierungsvektors gebildet wird. Das Molekulargewicht des F'-Fusionsproteins wurde aufgrund der DNA Sequenz (Sanger et al. 1978; Peden 1983) nach Ableitung der Aminosäuresequenz mit 15,7 kd berechnet. Die Aminosäuresequenz des F'-Fusionsproteins ist im Anhang (4.) dargestellt.

Demnach können unter der Kontrolle von Lambda pL in Plasmid pSB35 folgende Genprodukte exprimiert werden:

D-Protein: 16,0 kd
E-Protein: 10,0 kd
J-Protein: 5,0 kd
F'- Fusionsprotein: 15,7 kd

3.3.2. Quantifizierung der Protein-D und Protein-E Expression von Plasmid pSB35 im Vergleich mit der Protein-E Expression von Plasmid pSB12

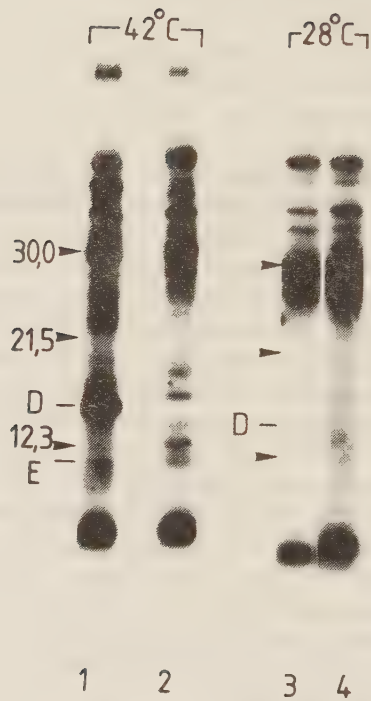
Zur Quantifizierung der plasmidcodierten Proteine D und E von Plasmid pSB35 bzw. Protein-E von Plasmid pSB12 im Minizellsystem wurden aus Uebernachtkulturen von E. coli DS410(pcI857,pSB12) und DS410(pcI857,pSB35) Minizellen isoliert. Zur Expression der unter Lambda pL klonierten Gene wurden die Minizellen 45 min bei 42 C unter induzierten Bedingungen mit 35-S-Methionin markiert. Analog wurden die Minizellen bei 28 C markiert. Bei 28 C sind die dem Lambda pL nachgeschalteten Gene reprimiert. Die Analyse der exprimierten Proteine erfolgte durch 14-20% SDS-PAGE (Abb.18A). Zur exakten Quantifizierung von Protein-E wurden in Spur 1 und 2 (Abb.18A) jeweils 110000 cpm und in den Spuren 3 und 4 (Abb.18A) jeweils 65000 cpm aufgetragen.

Unter induzierten Bedingungen (42 C) war Protein-D als Hauptproteinbande im Gesamtproteinmuster von E. coli DS410(pcI857,pSB35) (Abb.18A: Spur 1) eindeutig identifizierbar. Das Molekulargewicht von ungefähr 16 kd stimmte mit dem in der Literatur beschriebenen überein (Barrell et al. 1976). Unter reprimierten Bedingungen (28 C) war Protein-D im Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB35) nur äußerst schwach erkennbar (Abb.18A: Spur 3).

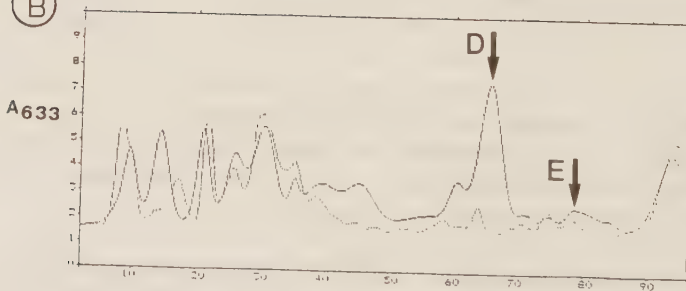
Protein-E konnte sowohl im Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB35) (Abb.18A: Spur 1) als auch im Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB12) (Abb.18A: Spur 2) unter induzierten Bedingungen (42 C) gegenüber den Kontrollen (Abb.18A: Spur 3 und 4) mit einem Molekulargewicht von ungefähr 10 kd nachgewiesen werden.

Das von Plasmid pSB35 kodierte F'-Fusionsprotein konnte nicht lokalisiert werden. Da sein Molekulargewicht von 15,7 kd ungefähr dem von Protein-D (16 kd) entspricht, wurde es möglicherweise durch das stark exprimierte Protein-D überdeckt. Protein-J war

(A)



(B)



**Abb.18: Quantifizierung von Protein-E in E. coli
DS410(pcI857,pSB12) und DS410(pcI857,pSB35)**

**A: Vergleich der Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB12)
und DS410(pcI857,pSB35) in der 14-20% SDS-PAGE**

Das Fluorogramm zeigt die Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB35) (Spur 1) und DS410(pcI857,pSB12) (Spur 2) nach 35-S-Methionin Markierung bei 42 C. Die Spuren 3 und 4 geben die Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB35) bzw. von DS410(pcI857,pSB12) unter reprimierten Bedingungen (28 C) wieder. Die Molekulargewichte (kd) der Markerproteine und die Positionen der Proteine D und E sind angegeben.

**B: Quantifizierung der Proteine D und E im Protein-
muster von DS410(pcI857,pSB35) und Protein-E im
Proteinmuster von DS410(pcI857,pSB12)**

Das Densitogramm zeigt den Vergleich der Spuren 1 und 2 des Fluorogramms von Abb.18A.

(IIII) Scan des Proteinmusters von DS410(pcI857,pSB35)
(....) Scan des Proteinmusters von DS410(pcI857,pSB12)
Die Positionen der Proteine D und E sind angegeben.

nach 35-S-Methionin Markierung aus dem erwähnten Grund (mögliche Abspaltung des N-terminalen Methionin) nicht nachweisbar. Das Densitogramm des Proteinmusters von DS410(pcI857,pSB35) unter induzierten Bedingungen (entspricht Spur 1 der Abb.18A) ist in Abbildung 18B dargestellt. Die Quantifizierung ergab für die Protein-D Bande einen Anteil von 17,5% am markierten Gesamtprotein.

Durch densitometrische Quantifizierung konnte die exprimierte Protein-E Menge in DS410(pcI857,pSB35) im Verhältnis zum markierten Gesamtprotein mit 2,1% ermittelt werden, während die Menge an Protein-E in DS410(pcI857,pSB12) im Vergleich zum markierten Gesamtprotein 1,9% betrug. Das entsprechende Densitogramm der Spuren 1 und 2 der Abbildung 18A ist in Abbildung 18B wiedergegeben.

In der Aminosäuresequenz der Proteine D und E sind außer dem N-terminalen Methionin jeweils 2 Methionine vorhanden. Dadurch kann die Protein-D Expression direkt mit der Protein-E Expression in DS410(pcI857,pSB35) verglichen werden. Protein-D wurde gegenüber Protein-E ungefähr um den Faktor 10 stärker exprimiert. Damit wurde das in früheren Untersuchungen (Pollock et al. 1978) ermittelte Mengenverhältnis zwischen beiden Proteinen bestätigt. Die Menge an Protein-E lag nach Gen E Expression in DS410(pcI857,pSB12) und DS410(pcI857,pSB35) in der gleichen

Größenordnung. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit den Befunden der Lysetests (Abb.17), in denen gezeigt werden konnte, daß die Gen D Kotranslation nur einen äußerst schwachen Einfluß auf die Gen E Expression ausübt. Die Gen E Ribosomenbindungsstelle muß somit auch während der Gen D Kotranslation für Ribosomen zugänglich sein. Zusammenfassend kann deshalb festgestellt werden, daß keine translationale Kopplung der Gen D und Gen E Expression vorliegt und die Gen D Kotranslation kein Kontrollmechanismus der Gen E Expression auf translationaler Ebene darstellen kann.

4. Einfluß von Protein-K auf die PhiX174 und

Protein-E induzierte Lyse von E. coli

Mutanten von PhiX174, die eine amber Mutation in Gen K tragen, ermöglichen eine normale Phagenentwicklung. Daher wurde dem Protein keine essentielle Rolle in der Phagenentwicklung zugesprochen (Tessman et al. 1980). Jedoch zeigten diese amber Mutanten in Gen K gegenüber PhiX174wt auf E. coli (su-) kleinere Plaques und eine um das 2-3 fache reduzierte "burst size" (Tessman et al. 1980). Dieses phänotypische Verhalten von PhiX174 amber K Mutanten wurde durch weitere Untersuchungen (Gillam et al. 1985) belegt. Durch zielgerichtete Mutagenese konnte ein Basenaustausch in Nukleotidposition 70 (T-->A) der PhiX174 DNA-Sequenz eingeführt werden (Gillam et al. 1985). Der Basenaustausch beeinflusste die Aminosäuresequenz des unterliegenden Gens A nicht, während in die Gen K Sequenz ein Stoppcodon eingeführt wurde, das zum Kettenabbruch nach der 6. Aminosäure führt. Diese "konstruierte" Gen K amber Mutante von PhiX174 wies gegenüber dem Wildtypphagen ebenfalls eine 3-6 fache Reduktion der "burst size" auf (Gillam et al. 1985).

Die Untersuchungen wiesen auf eine mögliche antagonistische Funktion von Protein-K im Protein-E induzierten Lyseprozeß hin. Es wurde vermutet, daß die Abwesenheit von Protein-K in PhiX174 amber K Mutanten zur frühzeitigen Lyse der Wirtszellen führt und die reduzierte "burst size" dieser PhiX174 Mutanten bewirkt. Die Hypothese wurde durch Aminosäuresequenzvergleich zwischen Protein-E und K unterstützt. Sequenzhomologien zwischen beiden Proteinen liegen vor allem im hydrophoben N-terminalen Bereich vor und ließen auch für Protein-K eine membranassoziierte Funktion vermuten (Shaw et al. 1978). Da die Membraninsertion von Protein-E eine notwendige Voraussetzung für die Protein-E induzierte Lyse darstellt (Bläsi et al. 1983), könnte die Membranlokalisation von Protein-K seine angenommene antagonistische Funktion in der Protein-E Lyse erklären. In dieser Arbeit sollte daher zunächst die theoretisch vorhergesagte Membranlokalisation von Protein-K experimentell bestätigt und sein möglicher Einfluß auf die Phagenlyse durch PhiX174 sowie auf die Protein-E induzierte Lyse allein überprüft werden. Dazu wurde Gen K aus der PhiX174 RF-DNA isoliert und unter der Kontrolle von Lambda pL kloniert.

ØX 174

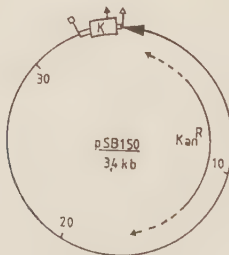
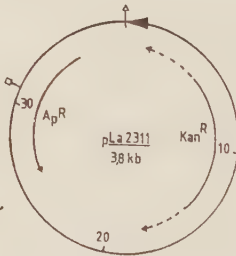
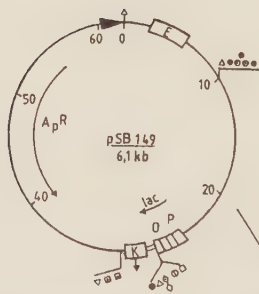
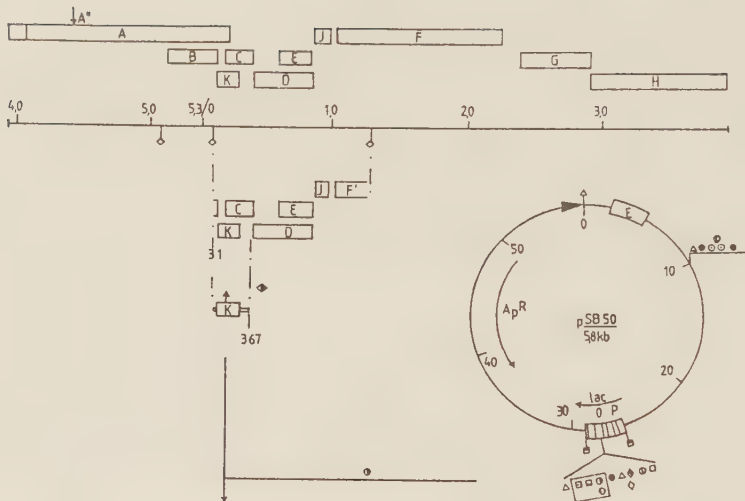


Abb.19: Konstruktion von Plasmid pSB150

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB150 ist im Text dargestellt. Die PhiX174 Gene sind mit Buchstaben bezeichnet und entsprechend ihrem Leseraster eingezeichnet. Die Skala gibt die Positionen der PhiX174 Gene auf der Genkarte in kb an. Die Transkriptionsrichtungen von Lambda pL (►) und lac Promotor (lacPO) sind durch Pfeile dargestellt. Die Plasmidkarten sind in Abschnitte von 1000 bp unterteilt. Die eingerahmten Restriktionsstellen von Plasmid pSB50 geben Einzelschnittstellen an. Die am Anfang und Ende des Gen K Fragmentes stehenden Zahlen geben die Positionen auf der PhiX174 Genkarte an. Symbole für Restriktionsenzyme:

◇ HpaI; ◆ SfaNI; △ EcoRI; ● BamHI; ⊙ HindIII; ⊗ BalI;
■ PvuII; □ PstI; ⊕ HindII; ◇ AccI; ◇ SalI; ▽ TaqI;
⊙ SmaI; ● XmaI; □ KpnI; ⊞ SacI; ▲ XhoI;

4.1. Konstruktion von Plasmid pSB150

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB150 ist in Abb.19 dargestellt. Der HpaI Verdau der PhiX174 RF-DNA ergab 3 Fragmente. Nach Isolation des 1264er Fragmentes (vergl. Konstruktionsweg von Plasmid pSB35 in Abb.15), das die Gene C, D, E, J, K und ein Teil des Gens F trug, wurde es mit SfaNI nachverdaut und das entstandene 341er Fragment (Abb.19) isoliert. Das 341er Fragment codiert für Gen K und einen Teil des Gens C. Nach Auffüllen der SfaNI Schnittstelle wurde dieses Fragment in die SmaI Schnittstelle von Plasmid pSB50 (siehe Abb.46A) ligiert. Der Ligaseansatz wurde anschließend in *E. coli* pop2135 transformiert. Nach Plasmid DNA Isolation von Amp resistenten Klonen erfolgte die Suche nach Plasmiden, die gegenüber dem Ausgangsvektor ein höheres Molekulargewicht aufwiesen. Auf dem klonierten 341er PhiX174 Fragment kommt eine XhoI Schnittstelle vor, die in Gen K liegt (Abb.19). Durch die Insertion des 341er Fragmentes in Plasmid pSB50, das selbst keine XhoI Schnittstelle aufweist, wurde daher eine singuläre XhoI Schnittstelle in das rekombinante Plasmid eingeführt. Die Orientierung des inserierten Fragmentes zum lac Promotor konnte damit durch PstI/XhoI Doppelverdau (Abb.19; Abb.20A) bestimmt werden. Die Größe der beiden möglichen PstI/XhoI Fragmente, die aufgrund der ungerichteten Klonierung auftreten konnten, wurde aus der Literatur (Sanger et al. 1978; Rüther et al. 1981; Schüller et al. 1985) berechnet. In allen sechs gefundenen

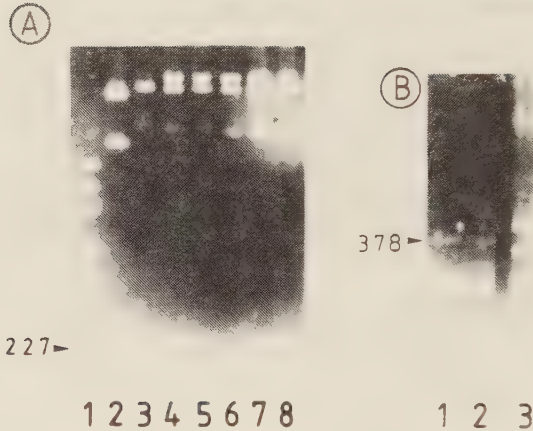


Abb.20: Restriktionskartierung der Plasmide pSB149 und pSB150

Als Marker wurden in den nachfolgenden Kartierungen TaqI verdaute PhiX174 RF DNA (M1) mit den Fragmentgrößen 2914; 1175; 404; 327; 231; 141 und 87 sowie HaeIII verdaute PhiX174 RF DNA (M2) mit den Fragmentgrößen 1353; 1078; 872; 603; 310; 278; 274; 234; 194 und 118 eingesetzt.

A: PstI/XhoI Verdau von Plasmid pSB149

Nach dem PstI/XhoI Verdau wurden die Plasmide auf einem 2% Agarosegel aufgetragen. Der Verdau lieferte bei allen untersuchten Klonen (Spur 3 - 8) ein 227er Fragment, das die Orientierung von Gen K zum lac Promotor in Plasmid pSB149 festlegt (Text). In Spur 1 sind DNA Marker (M2) aufgetragen.

B: PstI/EcoRI Verdau der Plasmide pSB149 und pSB150

Die Plasmide pSB149 (Spur1) und pSB150 (Spur 2) wurden mit PstI/EcoRI verdaut und auf einem 1,8% Agarosegel aufgetragen. In Spur 3 sind DNA Marker (M1) aufgetragen. Die 378er EcoRI/PstI Fragmente von pSB149 und pSB150 sind angegeben.

rekombinanten Plasmiden trat nach PstI/XhoI Verdau ein 227er Fragment auf (Abb.20A). Aufgrund dieser Restriktionskartierung war Gen K somit in allen rekombinanten Plasmiden mit seinem 3' Ende zum lac Promotor orientiert, so daß keine Protein-K Synthese in dem mit pSB149 bezeichneten Plasmid (Abb.19) möglich war. Gen K wurde aus Plasmid pSB149 auf einem 378er EcoRI/PstI Fragment

(Abb.20B) reisoliert und gerichtet in den mit EcoRI und PstI linearisierten Vektor pLa2311 (Remaut et al. 1981) kloniert. Die Klonierung in die EcoRI/PstI Schnittstelle zerstörte das β -Lactamasegen in Plasmid pLa2311. Nach Transformation des Ligaseansatzes in *E. coli* pop2135 wurde deshalb zunächst auf Kan Platten selektioniert. Die gesuchten Klone konnten anschließend durch Replikaplattierung auf Kan/Amp Platten identifiziert werden. Die Analyse der Plasmid-DNA Amp sensitiver Klone mit PstI/EcoRI (Abb.20B) bestätigte die Insertion des 378er Fragmentes in Plasmid pLa2311. Aufgrund der gerichteten Klonierung des 378er Fragmentes in pLa2311 war Gen K mit seinem 5' Ende zum Lambda pL orientiert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pSB150 (Abb.19).

4.2. Einfluß von Protein-K auf das Wachstum von *E.coli*

In Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *E. coli* nach Induktion der Gen K Expression zeigte Protein-K keinen Einfluß auf die Wachstumsrate (Abb.21). Sie war in *E. coli* pop2135(pSB150) und in pop2135(pLa2311) (Klonierungsvektor) unter induzierten Bedingungen (42 C) annähernd identisch.

4.3. Nachweis von Protein-K in *E. coli*

Zum Nachweis der theoretisch vorhergesagten Membranlokalisation von Protein-K (Shaw et al. 1978) wurde der *E. coli* Minizellstamm DS410 verwendet. Da sowohl Plasmid pSB150 als auch das Repressorplasmid pcI857 den gleichen Resistenzmarker (Kan) tragen, war die gleichzeitige Selektion beider Plasmide in DS410 nicht möglich. Protein-K war für *E. coli* weder letal noch wachstumshemmend (Abb.21). Es konnte daher auf die kontrollierte Expression von Gen K verzichtet werden. Die Gen K Expression in DS410(pSB150) erfolgte somit konstitutiv. Um Protein-K im Proteinmuster von DS410(pSB150) eindeutig nachzuweisen, wurde das Protein zunächst in *E. coli* pop2135(pSB150) durch Vergleich der unter induzierten (42 C) und nicht induzierten Bedingungen (28 C) synthetisierten Proteine identifiziert und seine Molekulargewichtsposition im PAA-Gel bestimmt.

4.3.1. Sequenzanalyse von Plasmid pSB150

Das unter der Kontrolle von Lambda pL klonierte 341er PhiX174 Fragment codiert für Protein-K (Molekulargewicht: 6,0 kd) und für

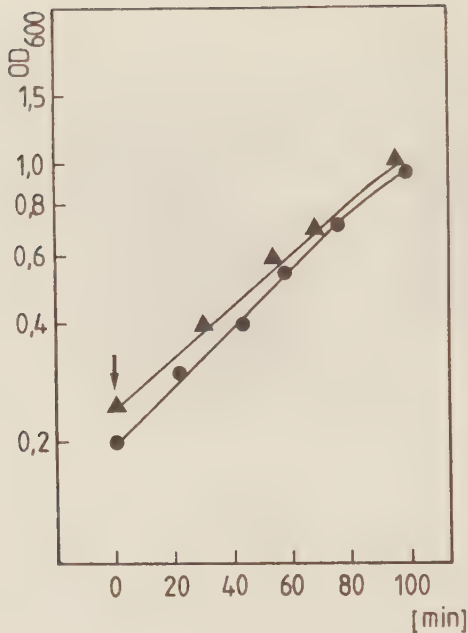


Abb.21: Einfluß von Protein-K auf die Wachstumsrate von E. coli

E. coli pop2135(pLa2311) (▲-▲) und pop2135(pSB150) (●-●) wurden unter Selektionsbedingungen in LB-Medium bei 28 C angezogen. Bei OD 600 von 0,2 erfolgte in beiden Kulturen Temperaturerhöhung auf 42 C (Pfeil).

ein Fusionsprotein zwischen dem Gen C Anteil von PhiX174 und dem Amp Gen Anteil von Plasmid pLa2311 (Abb.19). Die Nukleotidsequenz des Hybridgens konnte aus der DNA-Sequenz von PhiX174 (Sanger et al. 1978) und von Plasmid pBR322 (Sutcliffe 1979) zusammengestellt werden. Aus der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz, die im Anhang (5.) dargestellt ist, ließ sich das Molekulargewicht des so bezeichneten C'-Amp'-Fusionsproteins mit 21,2 kd berechnen.

4.3.2. Nachweis von Protein-K in *E. coli* pop2135

Zum Nachweis von Protein-K im Proteinmuster von pop2135(pSB150) wurden die Zellen bei 28 C bis zur OD 600 von 0,3 in DM-Medium angezogen. Zur Expression der Lambda pL nachgeschalteten Gene von Plasmid pSB150 wurden 200 ul der Kultur für 10 min bei 42 C vorinkubiert und dann 3 min bei 42 C mit 15 uCi 3-H-Leucin markiert.

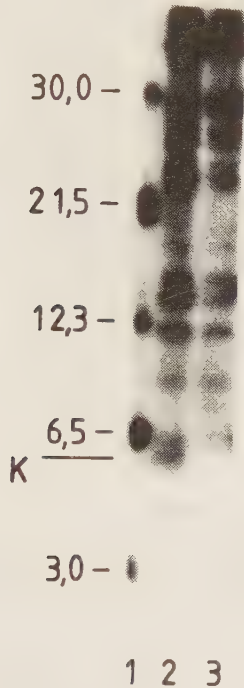


Abb.22: Nachweis von Protein-K in *E. coli* pop2135

Das Fluorogramm zeigt die Auftrennung der 3-H-Leucin markierten Proteine von pop2135(pSB150) in der 15-23,5% SDS-PAGE. In Spur 2 und 3 wurden jeweils 50000 cpm aufgetragen.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker (kd)

Spur 2: pop2135(pSB150) (42 C)

Spur 3: pop2135(pLa2311) (28 C)

Die Position von Protein-K ist angegeben.

Ebenso wurde pop2135(pSB150) unter reprimierten Bedingungen (keine Expression der Lambda pL nachgeschalteten Gene) bei 28 C mit 3-H-Leucin markiert. Zur Markierung der synthetisierten Zellproteine wurde 3-H-Leucin verwendet, da in der Aminosäuresequenz von Protein-K nur das aminoterminal Methionin vorkommt, das möglicherweise abgespalten wird. Nach Abstoppen der Reaktionen durch Zentrifugation, waschen in DM-Medium und Aufnahme in Proteinprobepuffer, wurde das Muster der markierten Proteine in einem 15-23,5% SDS-PAA Gel analysiert. Das Fluorogramm des PAA-Gels ist in Abbildung 22 dargestellt. Unter induzierten Bedingungen konnte Protein-K im Proteinmuster von pop2135(pSB150) (Abb.22: Spur 2) eindeutig unterhalb der 6,5 kd Bande des Molekulargewichtsmarkers Aprotinin mit einem Molekulargewicht von ungefähr 6 kd nachgewiesen werden. Die Protein-K spezifische Bande war im Proteinmuster von pop2135(pSB150) (Abb.22: Spur 3) unter reprimierten Bedingungen nicht sichtbar.

4.3.3. Nachweis von Protein-K in der Membranfraktion von E. coli DS410

Zum Nachweis von Protein-K in der Membranfraktion von E. coli wurden Minizellen von E. coli DS410(pSB150) und DS410(pLa2311) isoliert. Plasmid pLa2311 stellt den Ausgangsvektor von Plasmid pSB150 dar, so daß die Proteinmuster von DS410(pLa2311) bei 42 C und 28 C als Kontrolle zur Identifizierung von Protein-K herangezogen werden konnten. Die Markierung der plasmidcodierten Proteine von DS410(pSB150) und DS410(pLa2311) erfolgte für 45 min bei 42 C in M9-Medium, das 15 uCi 3-H markierte Aminosäuren (Aminosäuremix) enthielt. Ebenso wurde DS410(pLa2311) bei 28 C markiert. Nach der Markierung wurden die Minizellen abzentrifugiert, einmal mit M9-Medium gewaschen und entweder in Protein-Probepuffer aufgenommen oder zur Isolation der cytoplasmatischen Fraktion und der Membranfraktion (siehe Methodenteil: Punkt 11) durch Lysozym/EDTA aufgeschlossen. Die Proteinmuster der verschiedenen Ansätze wurden durch SDS-PAGE analysiert. Das Fluorogramm des 15-23,5% PAA-Gels ist in Abbildung 23 wiedergegeben.

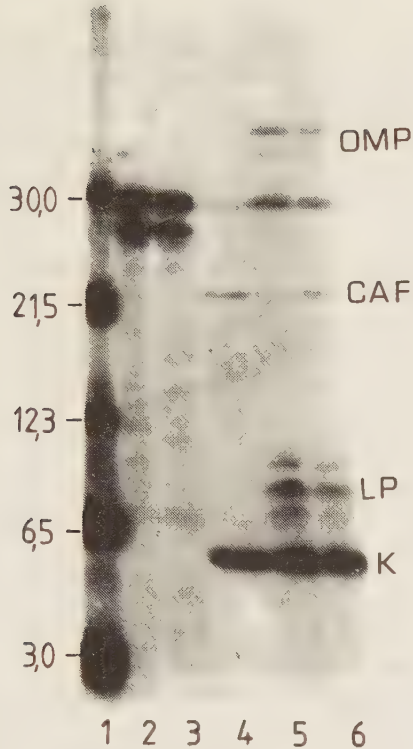


Abb.23: Nachweis von Protein-K in Minizellen von *E. coli* DS410

Das Fluorogramm zeigt die Auftrennung der Proteine von DS410(pLa2311) und DS410(pSB150) nach Markierung mit einem 3-H-Aminosäuremix in der 15-23,5% SDS-PAGE. In den Spuren 2-6 wurden jeweils 25000 cpm aufgetragen.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker (kd)

Spur 2: DS410(pLa2311) (28 C)

Spur 3: DS410(pLa2311) (42 C)

Spur 4: DS410(pSB150) (cytoplasmatische Fraktion)

Spur 5: DS410(pSB150) (Membranfraktion)

Spur 6: DS410(pSB150) (Gesamtzellen)

Die Molekulargewichtspositionen von Protein-K (K), vom C'-Amp'-Fusionsprotein (CAF), der Hauptproteine der äußeren Membran (OMP) und vom Lipoprotein (LP) sind angegeben.

Protein-K konnte im Proteinmuster der cytoplasmatischen Fraktion (Abb.23: Spur 4), der Membranfraktion (Abb.23: Spur 5) und der Gesamtzellproteine (Abb.23: Spur 6) von *E. coli* DS410(pSB150) nachgewiesen werden. Im Proteinmuster der Kontrollen von DS410(pLa2311) war diese Proteinbande weder nach Markierung bei 28 C (Abb.23: Spur 2) noch nach Markierung bei 42 C (Abb.23: Spur 3) sichtbar.

Im Gegensatz zum Proteinmuster von pop2135(pSB150) (Abb.22: Spur 2) konnte das von Plasmid pSB150 codierte C'-Amp'-Fusionsprotein im Proteinmuster der cytoplasmatischen Fraktion (Abb.23: Spur 4) und der Gesamtzellproteine (Abb.23: Spur 6) von DS410(pSB150) identifiziert werden.

Protein-K ließ sich sowohl in der Membranfraktion, als auch in der cytoplasmatischen Fraktion von DS410(pSB150) nachweisen. Möglicherweise trugen das niedrige Molekulargewicht von Protein-K und seine, im Vergleich zu den übrigen plasmidcodierten Proteinen, starke Expression zur Anwesenheit in der cytoplasmatischen Fraktionen bei. Präparationsartefakte, die sich aus der Verunreinigung der Membranfraktion mit cytoplasmatischen Proteinen und umgekehrt ergeben könnten, konnten aus nachfolgenden Gründen ausgeschlossen werden:

Die Hauptproteine der äußeren Membran und das Lipoprotein kommen ausschließlich in der Membranfraktion vor (Braun und Bosch 1973; Lee und Inouye 1974). Ihre Gene werden auch in Minizellen aufgrund ihrer stabilen m-RNA's translatiert (Reeve 1979). Die Molekulargewichtspositionen der sogenannten OMP Proteine und des Lipoproteins sind in der Literatur beschrieben (Halegoua et al. 1977; Inouye et al. 1977; Reeve 1979; Reeve 1981). Diese Proteine (Abb.23: OMP; Lp) traten in der cytoplasmatischen Fraktion (Abb.23: Spur 4) nicht auf, wodurch die Verunreinigung der Fraktion mit Membranproteinen ausgeschlossen werden konnte. Der Nachweis von Protein-K in der cytoplasmatischen Fraktion ist demnach nicht auf einen Präparationsfehler zurückzuführen. Andererseits sollte das C'-Amp'-Fusionsprotein mit dem errechneten Molekulargewicht von 21,2 kd aufgrund seiner Aminosäuresequenz ein lösliches Protein darstellen. Das Fusionsprotein konnte in der cytoplasmatischen Fraktion (Abb.23: Spur 4), aber nicht in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Vice versa konnte daher die Lokalisation von Protein-K in der Membranfraktion nicht auf Verunreinigungen mit cytoplasmatischen

Proteinen zurückgeführt werden.

Die theoretisch vorhergesagte Membranlokalisation von Protein-K (Shaw et al. 1978) konnte somit durch den Nachweis von Protein-K in der Membranfraktion von *E. coli* DS410 bestätigt werden.

4.4. Einfluß von Protein-K auf die Lyse von *E. coli* durch PhiX174

PhiX174 amber K Mutanten weisen gegenüber PhiX174wt eine reduzierte "burst size" auf (Tessman et al. 1980; Gillam et al. 1985). Es wurde daher vermutet, daß Protein-K die PhiX174 Lyse von *E. coli* verzögert und somit die frühzeitige Lyse von infizierten Zellen verhindert.

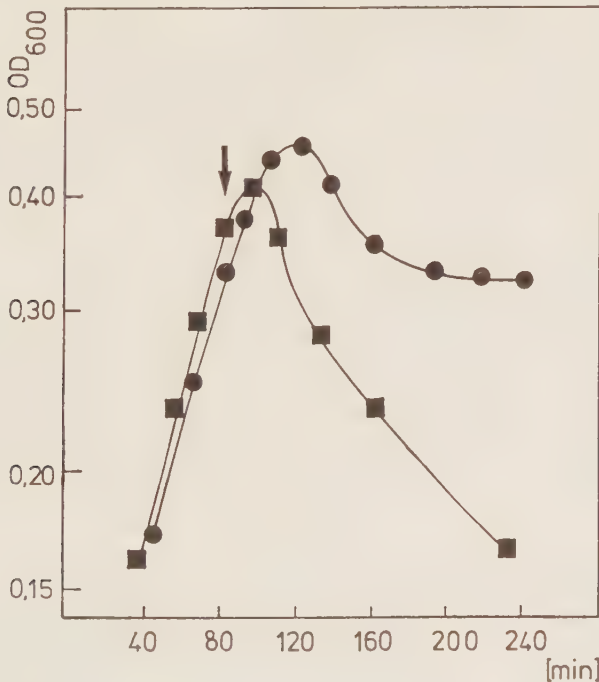


Abb.24: Einfluß von Protein-K auf die Lyse von *E. coli* durch PhiX174

E. coli pop2135(pSB150) (●-●) und pop2135(pLa2311) (■-■) wurden unter Selektionsbedingungen in LB-Medium angezogen. Zum Zeitpunkt, der durch den Pfeil angegeben ist, wurden die Zellen mit einer MOI von 5 mit PhiX174 infiziert.

Zur Ueberprüfung dieser Hypothese wurde *E. coli* PC1363 mit Plasmid pSB150 oder Plasmid pLa2311 (Kontrolle) transformiert. Die Gen K Expression erfolgte in *E. coli* PC1363(pSB150) konstitutiv (kein cI857 Repressor anwesend). Zur Infektion der plasmidtragenden Zellen wurde PhiX174wt verwendet.

Unterschiedliches Lyseverhalten von *E. coli* PC1363(pSB150) gegenüber PC1363(pLa2311) sollte nur auf dem Gen K Dosis Effekt in PC1363(pSB150) beruhen und auf die Wirkung von Protein-K zurückzuführen sein. Nach Infektion mit PhiX174 war der Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Lyserate in *E. coli* PC1363(pSB150) gegenüber PC1363(pLa2311) verzögert (Abb.24). Der Lyseeintritt erfolgte in PC1363(pLa2311) 21 Minuten und in PC1363(pSB150) 42 Minuten nach Infektion mit PhiX174.

Die Bestimmung der neugebildeten Phagen 80 Minuten nach Infektion von *E. coli* PC1363(pSB150) und PC1363(pLa2311) zeigte, daß unter konstitutiver Gen K Expression in PC1363(pSB150) 5-10 mal mehr Nachkommenphagen gebildet wurden. Dies erklärt sich aus dem verzögerten Lyseeintritt von *E. coli* PC1363(pSB150) im Vergleich zu *E. coli* PC1363(pLa2311) nach PhiX174 Infektion (Abb.24).

4.5. Einfluß von Protein-K auf die Protein-E Lyse

Protein-K konnte in der Membranfraktion von *E. coli* lokalisiert werden (Abb.23). Es wurde daher angenommen, daß die beobachtete Verzögerung des Lyseeintritts und die reduzierte Lyserate von *E. coli* PC1363(pSB150) nach PhiX174 Infektion (Abb.24) auf eine Interaktion der beiden Membranproteine E und K zurückzuführen war. Um die Auswirkung von Protein-K auf die Protein-E induzierte Lyse zu untersuchen, wurden die Gene K und E in ein Plasmid kloniert.

4.5.1. Konstruktion von Plasmid pSB152

Zunächst wurde das 1011er EcoRI Fragment aus Plasmid pSB12 (Abb.3) reisoliert und in die EcoRI Einzelschnittstelle von Plasmid pLa2311 (Abb.19) inseriert. Die Gen E Expression unterliegt damit der Kontrolle von Lambda pL. Der Konstruktionsweg ist nicht gesondert wiedergegeben, da er analog der Plasmid pSB12 Konstruktion (vergl. Ergebnisteil A: Punkt 1.1.) erfolgte. Das rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pSB102 und ist in Abbildung 25 dargestellt.

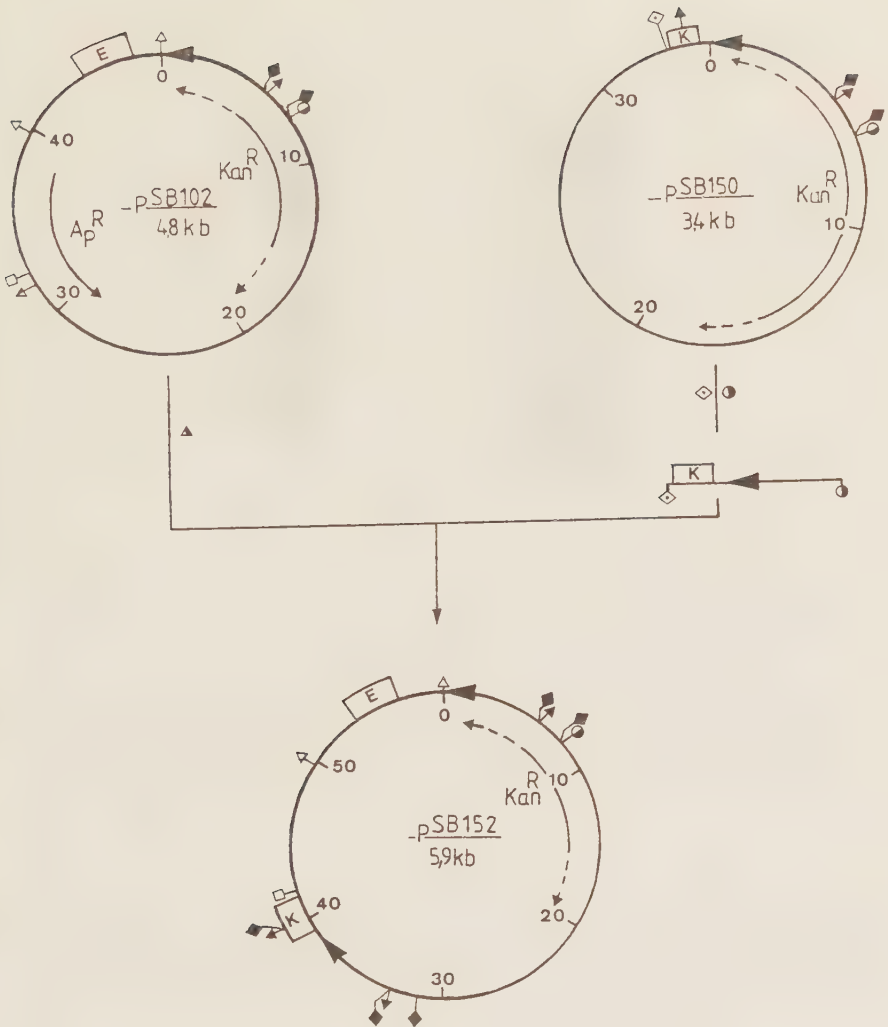


Abb.25: Konstruktion von Plasmid pSB152

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB152 ist im Text dargestellt. Die PhiX174 Gene sind mit Buchstaben bezeichnet. Die Transkriptionsrichtung von λ pL (►) ist durch Pfeile angegeben. Die Plasmide sind in Abschnitte von 1000 bp unterteilt. Die FspI und PstI Schnittstellen in Plasmid pSB102 repräsentieren Einzelschnittstellen. Symbole für Restriktionsenzyme:

◆ AvaI; △ EcoRI; ▲ FspI; ◇ MluI; □ PstI; ▲ XhoI; ● SmaI;

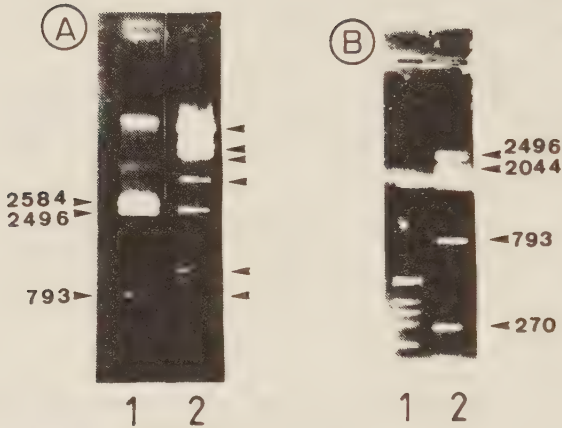


Abb.26: Restriktionsanalyse von Plasmid pSB152

A: Restriktionskartierung mit XhoI

XhoI schneidet innerhalb dem in Plasmid pSB152 klonierten 1128er MluI/SmaI Fragment 2 mal. Folgende XhoI Fragmente wurden in Abhängigkeit von der Insertionsrichtung des 1128er MluI/SmaI Fragmentes in Plasmid pSB152 (Transkriptionsrichtung des Gen K vorgeschalteten Lambda pL im Uhrzeigersinn (I) und gegen den Uhrzeigersinn (II)) aus der Literatur (Text) berechnet:

I	II
2584	2701
2496	2375
793	793

Nach XhoI Verdau von Plasmid pSB152 (Spur 1) wurden die Fragmente auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. In Spur 2 ist mit EcoRI verdaute P22 DNA mit den Fragmenten 19950; 9490; 7340; 4080; 2450; 1150; 1100; 860, die mit kleinen Pfeilen angegeben sind, als DNA Marker aufgetragen.

B: Restriktionskartierung mit AvaI

AvaI schneidet innerhalb dem in Plasmid pSB152 klonierten 1128er MluI/SmaI Fragment 3 mal. Der AvaI Verdau von Plasmid pSB152 (Spur 2) ergab nach Auftrennung im 2% Agarosegel die DNA Fragmente 2496; 2044; 793; 270 und 270. Diese stimmten mit den aus der Literatur berechneten (Text) überein und legten, wie der XhoI Verdau von Plasmid pSB152, die Transkriptionsrichtung des Gen K vorgeschalteten Lambda pL im Uhrzeigersinn fest. In Spur 1 ist mit HinfI verdaute Plasmid pBR322 DNA mit den Fragmenten 1600; 510; 500; 400; 340; 220 und 150 als DNA Marker aufgetragen.

In Plasmid pSB102 kommen sowohl im Ampicillin- als auch im Kanamycin Resistenz Gen Einzelschnittstellen vor (Abb.25), die zur Klonierung verwendet werden können.

Zur gemeinsamen Klonierung der PhiX174 Gene E und K in ein Plasmid wurde die Lambda pL - Gen K Region aus Plasmid pSB150 auf einem 1128er MluI/SmaI Fragment isoliert (Abb.25). Anschließend wurde die MluI Schnittstelle aufgefüllt und das 1128er Fragment in die FspI Einzelschnittstelle von Plasmid pSB102 ligiert. Durch die Klonierung in die FspI Schnittstelle von Plasmid pSB102 kam es zur Insertionsinaktivierung des β -Lactamasegens. Nach Transformation des Ligaseansatzes in *E. coli* pop2135 wurde daher zunächst auf Kan Platten bei 28 C selektioniert. Nach Replikaplattierung auf Amp/Kan Platten wurden 2 rekombinante Plasmide gefunden. Die Bestimmung der Insertionsrichtung des klonierten 1128er MluI/SmaI Fragmentes erfolgte durch XhoI und AvaI Verdau (Abb.26). Die Fragmente, die sich in Abhängigkeit von der Insertionsrichtung ergaben, konnten aus den bekannten Nukleotidsequenzen von Plasmid pBR322 (Sutcliffe 1979), der PhiX174 DNA Sequenz (Sanger et al. 1978) und der DNA Sequenz von Transposon Tn903 (Oka et al. 1981) berechnet werden. In beiden gefundenen Plasmiden war die Insertionsrichtung des 1128er MluI/SmaI Fragmentes identisch. Das Plasmid wurde mit pSB152 bezeichnet (Abb.25). In Plasmid pSB152 erfolgt die Transkriptionsrichtung des Gen K vorgeschalteten Lambda pL im Uhrzeigersinn, während Gen E gegen den Uhrzeigersinn transkribiert wird.

4.5.2. Auswirkung von Protein-K auf die Protein-E Lyse

Um den Einfluß von Protein-K auf die Protein-E Lyse zu testen, wurden *E. coli* pop2135(pSB102) und pop2135(pSB152) in LB-Medium bis zur OD 600 von 0,2 angezogen. Anschließend wurde die Gen E Expression von Plasmid pSB102 und die gleichzeitige Gen K und Gen E Expression von Plasmid pSB152 durch Temperaturerhöhung auf 42 C induziert. Der Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Lyserate von pop2135(pSB102) und pop2135(pSB152) wurden verglichen. Der Zeitpunkt des Lyseeintritts erfolgte sowohl in pop2135(pSB102) als auch in pop2135(pSB152) nach 13 Minuten und die Lyserate war in beiden Kulturen identisch (Abb.27). Demnach hatte Protein-K keinen meßbaren Einfluß auf die Protein-E induzierte Lyse. Der verzögerte Lyseeintritt und die reduzierte Lyserate

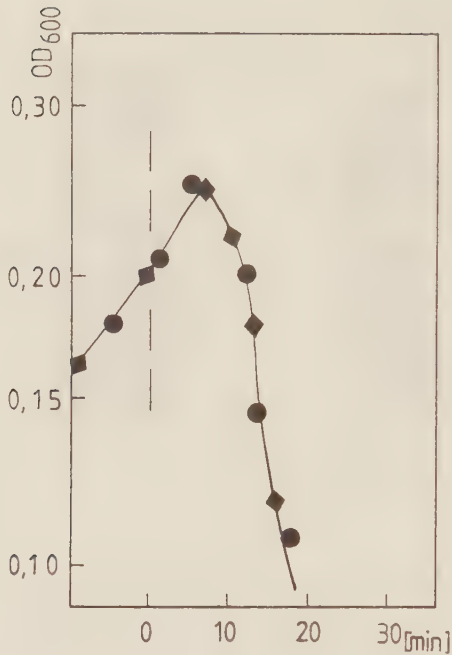


Abb.27: Einfluß der Gen K Expression auf die Protein-E Lyse

E. coli pop2135(pSB102) (◆◆) und pop2135 (pSB152) (●●) wurden unter selektiven Bedingungen in LB-Medium bei 28 C angezogen. Bei OD 600 von 0,2 (gestrichelte Linie) erfolgte Temperaturerhöhung auf 42 C.

von PC1363(pSB150) nach PhiX174 Infektion (Abb.24) kann deshalb nicht auf der Interaktion von Protein-K und Protein-E beruhen.

B. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der

Protein-E induzierten Lyse von E. coli

Nach Infektion von E. coli mit PhiX174 können nur exponentiell wachsende Zellen lysiert werden (Markert und Zillig 1965; Lubitz et al. 1984a). Nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 erfolgte der Lyseeintritt von K12 Δ HI Δ trp(pSB12) sehr rasch (Abb.6). Es sollte daher überprüft werden, ob stationäre Zellen nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 lysiert werden können und ob Protein-E in stationären Zellen funktionell stabil ist. Computergestützte Analysen ermöglichen aufgrund der bekannten Aminosäuresequenz von Protein-E Aussagen über seine Sekundärstruktur. Die Sekundärstrukturvorhersagen für Protein-E sollten experimentell durch Konstruktion geeigneter Fusionsproteine zwischen Protein-E Domänen und Fusionsanteilen anderer Proteine überprüft werden. Für diese Fusionsstudien wurden N-terminale Sequenzen von Protein-E ausgewählt, da in diesem Bereich die membranspannende Region und damit der zur Lyseinduktion notwendige Anteil des Proteins (Barrell et al. 1976; Young und Young 1982) vermutet wurde. Die gezielte Konstruktion von Fusionsproteinen sollte zur Lokalisierung der funktionellen Protein-E Domäne und zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse von E. coli beitragen.

1. Einfluß der Wachstumsphase von E. coli auf die Protein-E Lyse

Zur Untersuchung der Protein-E Wirkung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase wurde die Gen E Expression in E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) in unterschiedlichen Phasen des Wachstums induziert (Abb.28). Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen war die Lyseinduktion in E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) nur bis zur OD 600 von 1,0 (Abb.28) möglich. Die optische Dichte von 1,0 repräsentiert den Uebergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase (Abb.28). Stationäre Zellen von E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) konnten nach Gen E Expression nicht lysiert werden (Abb.28). Minizellen von E. coli DS410 sind nicht teilungsfähig und daher mit stationären Zellen vergleichbar (Reeve 1979). Nach Induktion der Gen E Expression in Minizellen war photometrisch keine Lyse meßbar. Als Maß für die Protein-E Wirkung wurde die Freisetzung

intrazellulärer Proteine und Nukleotide untersucht. Nach Isolierung der Minizellen von *E. coli* DS410(pcI857,pSB12) (Gen E wt Allel) und DS410(pcI857,pSB22) (Gen E am3 Allel) wurden diese mehrmals mit DM-Medium gewaschen und im gleichen Medium resuspendiert. Anschließend wurden beide Ansätze über einen Zeitraum von 4 Stunden bei 42 C inkubiert.

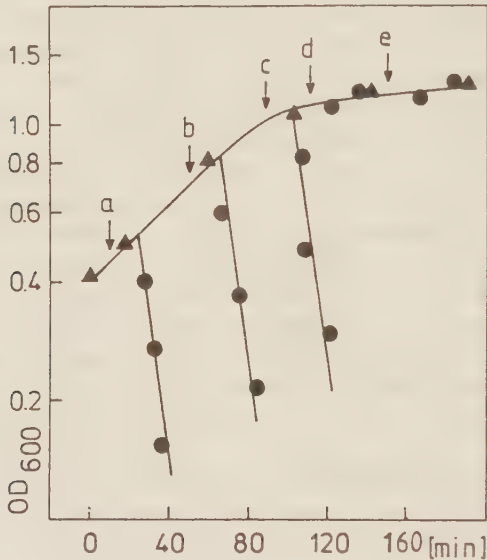


Abb.28: Induktion der GenE Expression von Plasmid pSB12 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB12) wurde in Gegenwart von Ampicillin bei 28 C (▲) angezogen. Zu den Zeitpunkten, die durch Pfeile (a-e) markiert sind, erfolgte Temperaturerhöhung auf 42 C (●●).

Zum Nachweis freigesetzter Nukleotide und Proteine wurden alle 30 Minuten 100 ul Kultur entnommen, abzentrifugiert und die Absorption gegen DM-Medium bei 230 und 260 nm gemessen. Sowohl in Minizellen von *E. coli* DS410(pcI857,pSB12), in denen unter induzierten Bedingungen (42 C) Protein-E synthetisiert wird (vergl. Abb.7 und 8), als auch in Minizellen von *E. coli* DS410(pcI857,pSB22), in denen keine Protein-E Synthese möglich

ist, war über den gesamten Zeitraum hinweg keine Freisetzung von Proteinen oder Nukleotiden feststellbar.

2. Funktionelle Stabilität von Protein-E

In stationären Zellen von *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB12) trat selbst nach ausgedehnten Inkubationszeiten (2-3 Stunden) bei 42 C keine Lyse ein. Demnach setzt die Protein-E induzierte Lyse von *E. coli* aktives Zellwachstum voraus.

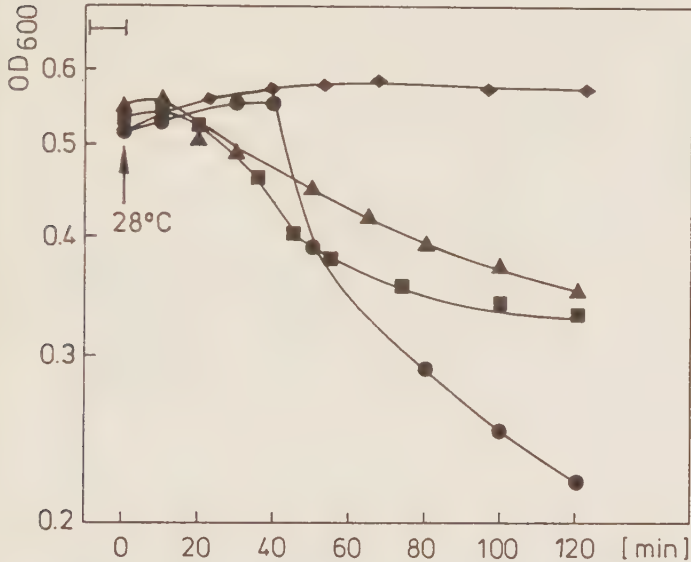


Abb.29: Effekt von Chloramphenicol und Rifampicin nach Stimulation des Wachstums in Protein-E haltigen Zellen

E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12) wurde in LB-Medium unter selektiven Bedingungen bei 28 C angezogen. Bei OD 600 von 1,2 erfolgte für 10 min Temperaturerhöhung auf 42 C (Balken). Nach Verdünnung mit frischem LB-Medium auf OD 600 von 0,5 wurde bei 28 C ohne Zugabe von Transkriptions- oder Translationsinhibitoren (●●), in Gegenwart von 100 ug/ml Chloramphenicol (■) oder in Gegenwart von 100 ug/ml Chloramphenicol und 10 ug/ml Rifampicin (▲▲) weiterinkubiert.

Zur Kontrolle wurde *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB12) bis zur OD von 1,2 bei 28 C angezogen, mit frischem LB-Medium verdünnt und in Gegenwart von 100 ug/ml Chloramphenicol und 10 ug/ml Rifampicin bei 28 C weiterinkubiert (◆◆).

Deshalb wurden stationäre Zellen von *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB12) mit einer OD 600 von 1,2 für 10 min bei 42 C zur Gen E Expression inkubiert, mit frischem LB-Medium auf eine OD 600 von 0,5 verdünnt und die Möglichkeit der Lyseinduktion durch Stimulation des Wachstums überprüft. Um auszuschließen, daß die einsetzende Protein-E Lyse nach Verdünnung durch weitere Gen E Expression hervorgerufen wird, wurde die Kultur anschließend bei 28 C weiterinkubiert.

40 Minuten nach Verdünnung der Zellkultur kam es zum Lyseeintritt von *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB12) (Abb.29). Eine geringe Protein-E de novo Synthese konnte aufgrund der temporären Inaktivierung des cI857 Repressors nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde der gleiche Versuch in Gegenwart von Transkriptions- und Translationsinhibitoren durchgeführt. Nach Zugabe von Chloramphenicol oder gleichzeitiger Zugabe von Chloramphenicol und Rifampicin war nach Verdünnung von stationären Kulturen, die zuvor 10 Minuten bei 42 C inkubiert worden waren, ebenfalls Lyse zu beobachten (Abb.29). Demnach war die Stimulation des Wachstums ohne weitere Protein-E Synthese zur Lyse ausreichend. Diese Untersuchung lieferte zugleich den Beweis für die Anwesenheit einer potentiell letalen Protein-E Konzentration in stationären Zellen von *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB12), die 10 Minuten bei 42 C inkubiert worden waren.

Nichtinduzierte Kulturen von *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB12) (28 C) lysierten nach Verdünnung sowie nach Chloramphenicol und Rifampicin Zugabe nicht. Aufgrund der Antibiotikazugabe war lediglich ein Wachstumsstillstand zu beobachten (Abb.29). Gleichzeitig zeigten die Untersuchungen, daß die funktionelle Stabilität von Protein-E innerhalb von stationären Zellen erhalten bleibt. Nach Verdünnung lysierten Zellen, in denen die Gen E Expression in stationärer Phase für 20 min induziert worden war, die anschließend aber nicht sofort verdünnt, sondern für 2 Stunden bei 28 C bis zur Verdünnung und Wachstumsimpuls weiterinkubiert wurden (nicht dargestellt).

3. Untersuchung der funktionellen Domänen von Protein-E

3.1. Strukturbetrachtungen von Protein-E

Die aus der Nukleotidsequenz von Gen E abgeleitete Aminosäuresequenz von Protein-E ermöglicht Vorhersagen zur

Sekundärstruktur des Proteins. Diese Strukturvoraussagen von Protein-E basieren auf der Hydrophilizität (Hopp und Woods 1981), der Hydrophobizität (Kyte und Doolittle 1982), der Oberflächenwahrscheinlichkeit (Emini et al 1985) und Flexibilität (Karplus und Schulz 1985) der im Protein vorkommenden Aminosäuren. Die Vorhersagen nach Robson und Granier (Granier et al 1978) und nach Chou und Fasman (Chou und Fasman 1974a;b) geben darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit für alpha-helikale Bereiche, für Regionen mit β -Faltblattstruktur, für "Random coil Strukturen" und "Turn" Regionen eines Proteins an.

In Abbildung 30 und Tabelle 5 sind die Strukturvorhersagen für Protein-E dargestellt. Die Strukturvorhersagen nach Robson und Granier sowie nach Chou und Fasman ermöglichten die qualitative Unterteilung von Protein-E in 4 verschiedene Domänen (Abb.30A u. B; Tab.5A). Diese zeichnen sich durch geordnete alpha-helikale und/oder β -Faltblattstruktur aus und sind durch "Random coil Strukturen" oder "Turn" Regionen voneinander getrennt.

Mit Hilfe dieser Strukturvorhersagen können für die vorhergesagten Protein-E Domänen 1-4 folgende Aussagen getroffen werden (siehe Abb.30A u. B; Tab.5):

Die Domänen 1 und 2 zeigen Übereinstimmung mit Regionen von membranspannenden Proteinen (Heijne 1981; Michaelis und Beckwith 1982), da sie überwiegend hydrophob sind und eine geringe Oberflächenwahrscheinlichkeit besitzen.

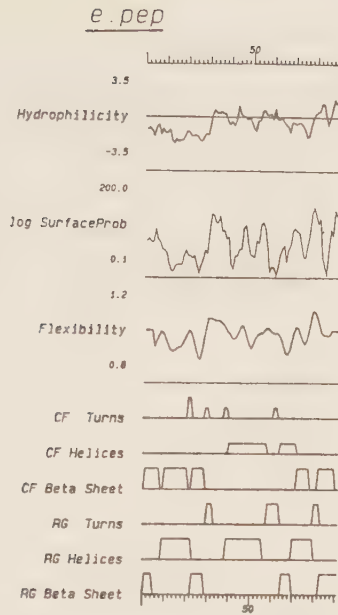
Domäne 3 zeigt ebenfalls Ähnlichkeit mit membranspannenden Regionen (Heijne 1981). Allerdings weist sie gegenüber den Domänen 1 und 2 eine erhöhte Oberflächenwahrscheinlichkeit auf.

Domäne 4 ist geordnet (β -Faltblattstruktur) und hydrophil. Aufgrund der Sekundärstrukturvorhersagen von Protein-E war zu vermuten, daß die membranspannende und somit funktionelle Region des Proteins die Protein-E Domäne 1 oder die Domänen 1 und 2 umfaßt.

Es sollte daher überprüft werden, ob die Protein-E Domänen 1 und 2 zur Lyseinduktion ausreichen, oder ob die Protein-E Domänen 3 und 4 ebenfalls zur Lyseinduktion benötigt werden.

A

Aminosäure- position	Aminosäure	Hydrophili- zitätswert	Oberflächen- wahrscheinlich- keit	Struktur nach Chou-Fasman	Struktur nach Rooson- Garnier
1	Met	0.067	1.392	B	B
2	Val	-0.800	1.683	B	B
3	Arg	-0.720	1.283	B	B
4	Trp	-0.620	1.308	B	B
5	Thr	-1.200	3.145	B	B
6	Leu	-1.200	1.589	B	B
7	Trp	-0.600	1.264	B	B
8	Asp	-0.880	0.781	B	B
9	Thr	-0.620	0.722	B	H
10	Leu	-0.440	0.874	B	H
11	Ala	-1.400	0.261	B	H
12	Phe	-1.680	0.180	B	H
13	Leu	-1.680	0.180	B	H
14	Leu	-1.980	0.242	B	H
15	Leu	-1.380	0.282	B	H
16	Leu	-1.380	0.282	B	H
17	Ser	-1.380	0.282	B	H
18	Leu	-1.380	0.489	B	H
19	Leu	-1.020	0.744	B	H
20	Leu	-1.020	0.489	B	H
21	Pro	-1.020	0.489	T	H
22	Ser	-1.020	0.404	T	H
23	Leu	-1.020	0.491	B	B
24	Leu	-1.280	0.243	B	B
25	Ile	-1.840	0.132	B	B
26	Met	-1.640	0.248	B	B
27	Phe	-1.480	0.374	B	B
28	Ile	-1.060	0.739	B	B
29	Pro	-0.880	0.562	T	T
30	Ser	-0.880	2.272	T	T
31	Thr	0.080	9.436	T	T
32	Phe	0.680	9.436	T	T
33	Lys	0.628	5.325		
34	Arg	0.420	4.970		
35	Pro	0.960	8.158		
36	Val	0.420	2.758		
37	Ser	-0.880	2.999		
38	Ser	-0.760	1.619	T	
39	Trp	-0.660	1.685	T	H
40	Lys	-0.480	0.274	H	H
41	Ala	-0.800	0.180	H	H
42	Leu	-0.180	0.491	H	H
43	Asn	-0.180	0.491	H	H
44	Leu	0.520	0.795	H	H
45	Arg	0.800	0.795	H	H
46	Lys	0.400	3.597	H	H
47	Thr	0.400	4.356	H	H
48	Leu	-0.480	1.282	H	H
49	Leu	-1.180	0.523	H	H
50	Met	-1.020	0.488	H	H
51	Ala	-0.800	0.419	H	H
52	Ser	-0.540	1.437	H	H
53	Ser	0.320	1.184	H	H
54	Val	0.060	4.287	H	H
55	Arg	0.600	5.379	H	H
56	Leu	0.340	3.535	H	H
57	Lys	0.480	0.910	T	T
58	Pro	-0.080	0.149	T	T
59	Leu	0.080	0.227	T	T
60	Asn	-0.460	0.208	T	T
61	Cys	0.140	0.112	T	T
62	Ser	0.140	0.208	T	T
63	Arg	0.100	0.529	T	T
64	Leu	0.100	0.609	H	
65	Pro	-0.280	1.064	H	B
66	Cys	-1.320	0.312	H	B
67	Val	-1.060	0.777	H	B
68	Tyr	-1.020	1.029	H	B
69	Ala	-0.220	2.989	H	B
70	Gln	0.000	3.480	H	H
71	Glu	0.100	2.837	H	H
72	Thr	0.120	2.603	B	H
73	Leu	-0.420	1.048	B	H
74	Thr	-1.380	0.423	B	H
75	Phe	-1.660	0.423	B	H
76	Leu	-1.380	1.053	B	H
77	Leu	-1.280	2.411	B	H
78	Thr	-0.180	9.738	B	H
79	Gln	0.800	15.877	H	H
80	Lys	1.080	8.916	T	T
81	Lys	0.960	4.696	T	T
82	Thr	0.620	7.040	B	T
83	Cys	0.520	0.417	B	B
84	Val	0.060	0.223	B	B
85	Lys	-0.320	0.118	B	B
86	Asn	-0.420	0.719	B	B
87	Tyr	0.480	3.125	B	B
88	Val	0.480	2.069	B	B
89	Arg	1.040	12.550	B	B
90	Lys	1.857	8.412	B	B
91	Glu	3.000	13.133	B	B



(B)

Tab.5: Strukturvorhersagen von Protein-E

A: Auflistung der ermittelten Daten

Die Aminosäuresequenz von Protein-E (As 1-91) ist dargestellt. Die über jeweils 5 Aminosäuren gemittelten Hydrophilizitätswerte und die Oberflächenwahrscheinlichkeit einzelner Aminosäuren sind angegeben.

Die Vorhersagen zur Sekundärstruktur stützen sich auf Computeranalysen, die nach den Regeln von Chou und Fasman und Robson und Granier erstellt wurden. B, b: β -Faltblattstrukturen; H, h: α -helikale Strukturen; T: "Turn" Regionen an; Klein- und Großbuchstaben geben die Wahrscheinlichkeit für die jeweilige Sekundärstruktur an. Die Protein-E Domänen 1-4 sind eingezeichnet.

**B: Graphische Darstellung der in Tab.5A
wiedergegebenen Daten**

Die obere und untere Skala zeigen die jeweiligen Aminosäurepositionen von Protein-E. CF: Vorhersagen nach Chou und Fasman; RG: Vorhersagen nach Robson und Granier;

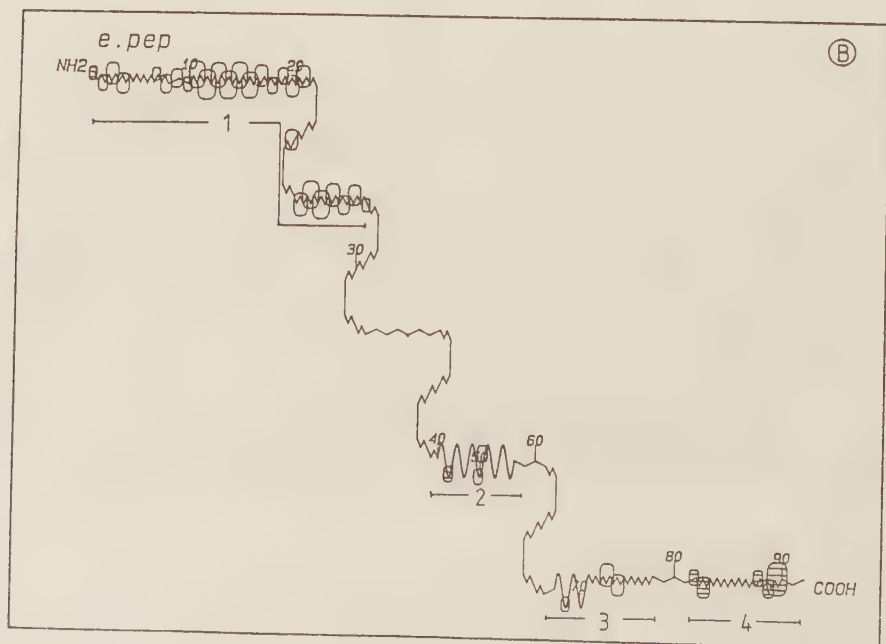
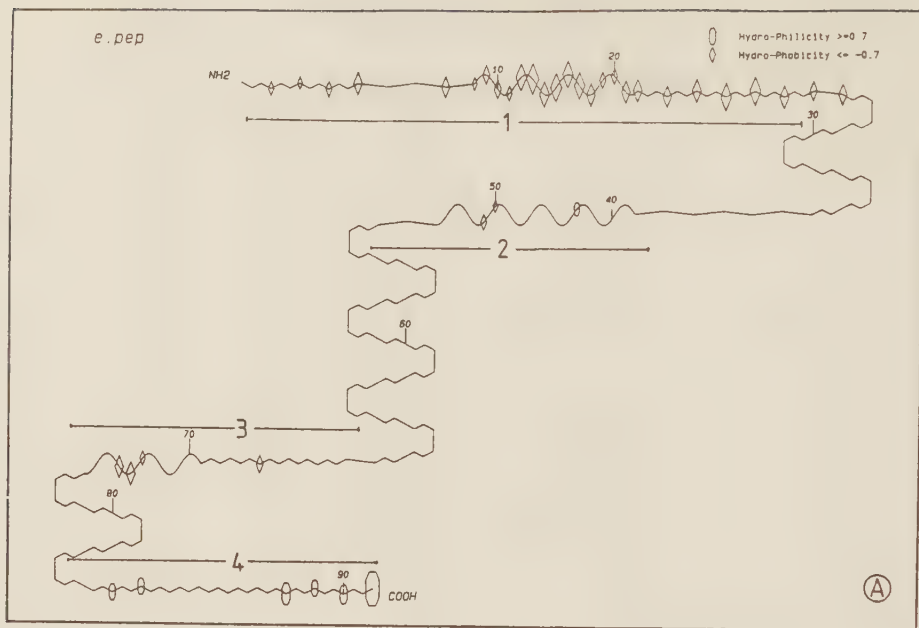


Abb.30: Graphische Darstellung der Sekundärstrukturvorhersagen von Protein-E

A: Robson-Granier Vorhersage der Sekundärstruktur von Protein-E

⌚ = "Turn"; ~~~ = "Random coil Struktur"; α = alpha-Helix;
β = β-Faltblatt; ◇ = hydrophobe Bereiche;
○ = hydrophile Bereiche;

B: Chou-Fasman Vorhersage der Sekundärstruktur von Protein-E

⌚ = "Turn"; ~~~ = "Random coil Struktur"; α = alpha-Helix;
β = β-Faltblatt; ○ = hydrophobe Bereiche;
⊖ = hydrophile Bereiche;

3.2. Konstruktion der Plasmide pSB1 und pSB4: Einfluß der Protein-E Domänen 3 und 4 auf das Lysepotential von Protein-E

Das Lysepotential der Protein-E Domänen 1 und 2 wurde durch Austausch der Protein-E Domänen 3 und 4 mit nicht näher verwandten Proteinsequenzen überprüft. Die ersten 51 Codons von Gen E (entspricht den Protein-E Domänen 1 und 2) wurden mit dem "alpha-Teil" des lacZ Gens im Leseraster des lacZ Gens und mit β-Lactamase Gensequenzen (außerhalb des Amp Gen Leserasters) fusioniert. Der Konstruktionsweg der Plasmide pSB1 (trägt Hybridgen E51'-lacZ') und pSB4 (trägt Hybridgen E51'-a'; a' bezeichnet die β-Lactamase Gensequenzen) ist in Abbildung 31 dargestellt.

Gen E wurde zunächst auf dem 1011er EcoRI Fragment aus Plasmid pUH12 isoliert (vergl. Konstruktion von Plasmid pSB12 in Abb.3). Anschließend wurde dieses Fragment mit TaqI nachgespalten und ein 231er TaqI Fragment isoliert (entspricht Nukleotid 490-721 der PhiX174 DNA). Das 231er TaqI Fragment trägt die Ribosomenbindungsstelle und die ersten 51 Codons von Gen E. Dieses Fragment wurde in die singuläre AccI Schnittstelle von Plasmid pUR222 (Rüther et al. 1981) ligiert und der Ligaseansatz in E. coli CAIQ1 transformiert. Die Suche nach Plasmiden mit Inserts erfolgte nach Plasmid DNA Isolation mit TaqI. Aufgrund der ungerichteten Klonierung des 231er TaqI Fragmentes, war die Orientierung von Gen E' (entspricht den 51 5'Codons) sowohl mit seinem 5' als auch mit seinem 3' Ende zum lac Promotor möglich. Die Bestimmung der Insertionsrichtung wurde mit HaeII und HaeIII (Abb.32A) durchgeführt.

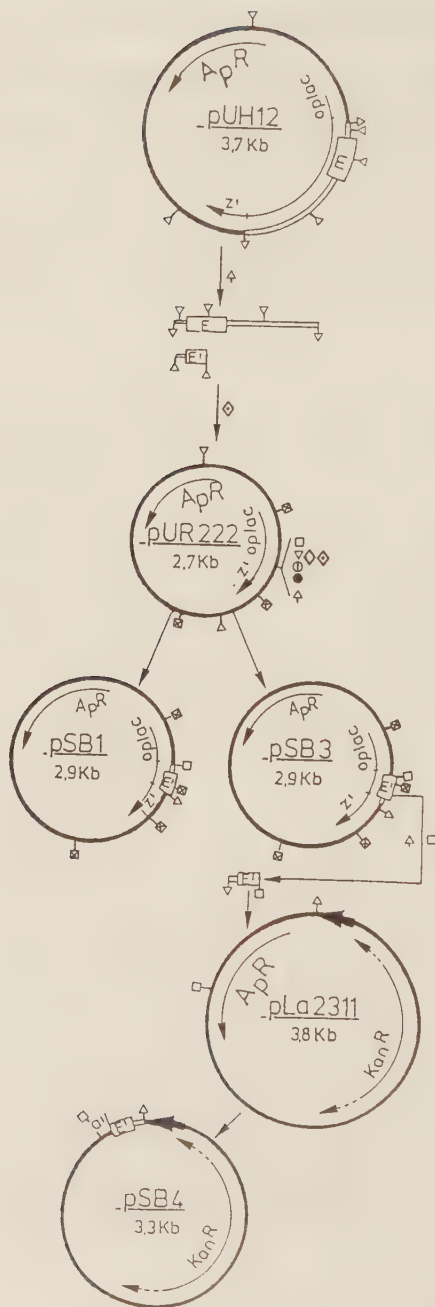


Abb.31: Konstruktion der Plasmide pSB1 und pSB4

Der Konstruktionsweg der Plasmide pSB1 und pSB4 ist im Text erläutert. PhiX174 Sequenzen sind als offene Balken eingezeichnet. E' bezeichnet die ersten 51 Codons von Gen E. Die Transkriptionsrichtungen von Lambda pL (►) und lac Promotor (lac PO) sind durch Pfeile dargestellt. Die Hybridgene E51'-a' und E51'-z' sind eingezeichnet. Symbole für Restriktionsenzyme:

△EcoRI; ☒HaeII; □PstI; ▽TaqI; ◇SalI; ◆AccI;
 ⊙HindII; ●BamHI;

E

MVRWTLWDTLAFLLLSLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLMA
--

SSVRLKPLNCSRLPCVYAQETLTFLTQKKTCVKNYVRKE

E'a'

MVRWTLWDTLAFLLLSLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLMA
--

STCSNGNNVAETINWRTTTSRFPATINRLDGGG

E'z'

MVRWTLWDTLAFLLLSLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLMA
--

STDPGNSLAVVLQRRDWNPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQ
 LRLSNGEWRSSASSLTDSLRSVRLRAVSAHSAKAVIRLSTESGDNAGKNM

Abb.33: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Protein-E und der Hybridproteine E'-a' und E'-z'

Die vollständige Aminosäuresequenz von Protein-E (E) ist im Einbuchstabencode (Fasman 1976) angegeben. Der eingerahmte Protein-E Anteil (As. 1-51) ist in beiden Hybridproteinen E'-z' und E'-a' gleich. Für beide Fusionsproteine sind die Aminosäuren des z' Anteils und des a' Anteils dargestellt.

In Plasmid pSB1 (Abb.31) war Gen E' mit seinem 5' Ende zum lac Promotor orientiert. In diesem Plasmid ist die Synthese eines Hybridproteins (Abb.33) zwischen den 51 N-terminalen Aminosäuren von Protein-E und dem alpha-Teil der β -Galaktosidase (E'-z') möglich. Die Aminosäuresequenz des z' Anteils im Fusionsprotein (Abb.33) wurde aus der Nukleotidsequenz des lacZ Gens (Kalmins et al. 1983) abgeleitet.

In Plasmid pSB3 (Abb.31) war Gen E' mit seinem 3' Ende zum lac Promotor orientiert. Aus diesem Plasmid wurde Gen E' auf einem 254er PstI/EcoRI Fragment reisoliert und gerichtet (mit seinem 5' Ende zum Lambda pL Promotor) in die PstI und EcoRI Schnittstellen von Plasmid pLa2311 (Remaut et al. 1981) kloniert. Da die Ampicillin Resistenz nach Insertion des Gen E' tragenden PstI/EcoRI Fragment verloren ging, wurde nach Transformation in E. coli K12 Δ HI Δ trp auf Kanamycin Platten bei 28 C selektioniert. Nach Anlegen einer Kanamycin "Master plate" wurden die Kolonien auf Amp/Kan Platten überstempelt. In denjenigen Klonen, die auf Amp/Kan Platten kein Wachstum zeigten, sollte Gen E' mit seinem 5' Ende zum Lambda pL Promotor orientiert sein. Nach Plasmid DNA Isolation und Restriktionsanalyse mit PstI und EcoRI (Abb.32B) wurde das gesuchte Plasmid pSB4 (Abb.31) identifiziert.

Von Plasmid pSB4 wird ein Hybridgen zwischen Gen E' (51 Codons) und Amp Gensequenzen (33 Codons) außerhalb des Leserasters der β -Laktamase exprimiert. Das Hybridprotein wurde mit E'-a' bezeichnet. Die Aminosäuresequenz des a' Anteils (Abb.33) wurde aus der bekannten Nukleotidsequenz von Plasmid pBR322 (Sutcliffe 1979) abgeleitet.

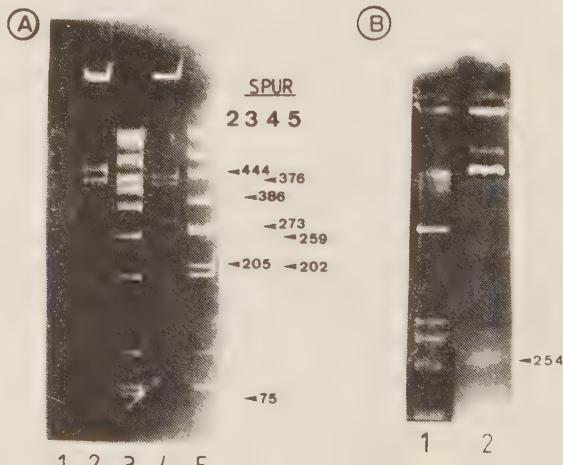


Abb.32: Restriktionsanalyse der Plasmide pSB1, pSB3 und pSB4

A: Restriktionsanalyse der Plasmide pSB1 und pSB3 mit HaeII und HaeIII

Die Restriktionsenzyme HaeII und HaeIII schneiden in dem klonierten Gen E' einmal. Daher konnte die Orientierung des inserierten 231er TaqI Fragmentes in Plasmid pSB1 und pSB4 (Text) durch Verdau mit diesen Enzymen und Größenvergleich der Restriktionsfragmente bestimmt werden. Die Größe der Restriktionsfragmente wurde mit Hilfe der bekannten DNA-Sequenzen von PhiX174 und Plasmid pUR222 errechnet. Nach Verdau mit HaeII und HaeIII ergeben sich für die Plasmide pSB1 und pSB3 folgende Fragmente, die auf einem 6% PAA-Gel aufgetrennt wurden:

pSB1/HaeII	pSB1/HaeIII	pSB3/HaeII	pSB3/HaeIII
1924	587	1924	587
→ 444	457	→ 376	457
370	434	370	434
→ 205	→ 386	→ 273	338
	338		267
	267		→ 259
	188		→ 202
	102		188
	80		102
	→ 75		80

Die mit Pfeilen markierten Fragmente bezeichnen die Restriktionsfragmente, die sich in Plasmid pSB1 und pSB3 aufgrund der unterschiedlichen Orientierungen zum lac Promotor ergeben.

Spur 1: Markerfragmente : (pUR222/HaeIII: 587; 457; 434; 338;
 Spur 2: pSB1/HaeII 267; 230; 188; 102; 80)
 Spur 3: pSB1/HaeIII
 Spur 4: pSB3/HaeII
 Spur 5: pSB3/HaeIII

B: Nachweis des Gen E' Inserts in Plasmid pSB4

Plasmid pSB4 wurde mit PstI und EcoRI verdaut und anschließend auf einem 6% PAA-Gel aufgetrennt.

Spur 1: Markerfragmente (PhiX174/TaqI: 2914; 1175; 404;
 Spur 2: pSB4: PstI/EcoRI 327; 231; 141; 87)
 Das 254er Fragment ist angegeben (Text).

3.2.1. Lysepotential der pSB1 und pSB4 codierten

Fusionsproteine E'-z' und E'-a'

In Plasmid pSB1 unterliegt Gen E51'-lacZ' der transkriptionalen Kontrolle des lac Promotors, während die Gen E51'-a' Expression in Plasmid pSB4 durch den Lambda pL Promotor kontrolliert wird. In Abbildung 34 ist die Wirkung der Hybridproteine E'-z' auf E.coli CAIQ1(pSB1) und E'-a' auf E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB4) dargestellt.

Beide plasmidtragende Stämme wurden bis zur OD 600 von 0,35 angezogen. Anschließend wurde die Synthese des E'-z' Hybridproteins in E. coli CAIQ1(pSB1) durch IPTG Zugabe und des

E'-a' Hybridproteins in *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB4) durch Temperaturerhöhung auf 42 C induziert.

Das Hybridprotein E'-z' hatte keinen Einfluß auf das Wachstum von *E. coli* CAIQ1(pSB1). Anzeichen von Zellyse waren nicht zu beobachten.

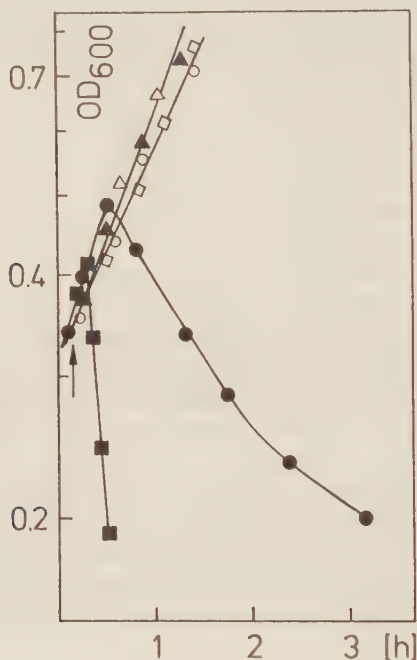


Abb.34: Expression der Gene E, E51'-a' und E51'-z' in *E. coli*

Die Induktion der E51'-z' Expression mit IPTG (Endkonzentration 5mM) im *E. coli* Stamm CAIQ1(pSB1) (□-□), der bei 37 C in LB-Medium unter selektiven Bedingungen angezogen wurde, erfolgte bei der OD 600 von 0,35 (Pfeil). (○-○) Wachstum von *E. coli* CAIQ1(pSB1) ohne Zugabe von IPTG.

E. coli K12 HI trp(pSB12) (▲-▲) und *E. coli* K12 Δ HI Δ trp(pSB4) (△-△) wurden in LB-Medium bei 28 C unter selektiven Bedingungen angezogen. Die Expression der Gene E in K12 Δ HI Δ trp(pSB12) (■-■) und E51'-a' in K12 Δ HI Δ trp(pSB4) (●-●) erfolgte durch Temperaturerhöhung auf 42 C bei OD 600 von 0,35 (Pfeil).

Dagegen führte das E'-a' Hybridprotein zur Lyse von E. coli K12ΔHIΔtrp(pSB4). Der Zeitpunkt des Lyseeintritts war nach Induktion der Gen E51'-a' Expression gegenüber der Gen E Expression von Plasmid pSB12 um 20 Minuten verzögert (Abb.34). Zur vollständigen Lyse der Kultur waren mehr als 2 Stunden notwendig.

Das lyse-positive E'-a' Fusionsprotein zeigte, daß die funktionelle Protein-E Domäne und damit der zur Lyseinduktion notwendige Anteil innerhalb der ersten 51 Aminosäuren von Protein-E (Protein-E Domänen 1 und 2) liegt. Andererseits war die lytische Wirkung der Protein-E Domänen 1 und 2 von der Aminosäurezusammensetzung des anfusionierten Restes abhängig, da das E'-z' Fusionsprotein lyse-negativ war. Es war daher anzunehmen, daß der anfusionierte Teil im E'-a' Fusionsprotein (Abb.33) im Gegensatz zu dem anfusionierten "alpha-Teil" der β -Galaktosidase im E'-z' Fusionsprotein bestimmte strukturelle Eigenschaften aufweist, die zur Erhaltung der Protein-E Tertiärstruktur beitragen. Damit wiesen diese Fusionsstudien gleichzeitig auf die wichtige Rolle der Protein-E Domänen 3 und 4 für die Protein-E Lyse hin. Dieser Protein-E Anteil konnte nur durch Aminosäuresequenzen ersetzt werden, die bestimmte strukturelle Voraussetzungen aufwiesen.

Physiologische Untersuchungen zum Mechanismus der Protein-E Lyse ergaben, daß das Ausfließen intrazellulärer Ionen und die Zellyse gleichzeitig eintreten (Witte et al. 1987). Ferner bleibt die morphologische Zellstruktur nach Protein-E Lyse weitgehend erhalten und die Bakterienzellen erscheinen lediglich optisch leer (Henrich und Plapp 1984). Darüber hinaus tritt während und nach der Protein-E Lyse von E. coli kein Mureinabbau ein (A. Witte, pers. Mitteilung). Die Gleichzeitigkeit von Lyseeintritt, Protein-Freisetzung und Ionenefflux sowie die relativ geringe Auswirkung auf die Zellstruktur nach Protein-E Lyse führten zur Hypothese, daß Protein-E eine transmembrane Pore in der Zellhülle von E. coli ausbildet, die zum Zusammenbruch des Membranpotentials und zur Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile führt. Die Bildung einer Protein-E spezifischen Pore würde jedoch die Formierung von Protein-E Oligomeren voraussetzen. Es wurde vermutet, daß die Protein-E Domäne 3 oder die Domänen 3 und 4 an der Oligomerisierung beteiligt sind und nur Oligomerisierungsstrukturen diesen Protein Anteil ersetzen

können. Um dieser Hypothese nachzugehen und gleichzeitig die funktionelle Protein-E Region weiter einzugrenzen, wurde die Wirkung eines E'- β -Gal-Fusionsproteins auf *E. coli* untersucht. Das Fusionsprotein war aus den ersten 30 N-terminalen Protein-E Aminosäuren (Protein-E Domäne 1) und β -Galaktosidase zusammengesetzt. Da β -Galaktosidase im nativen Zustand ein Tetramer darstellt (Zipser 1963) wurde vermutet, daß dieser Anteil des Fusionsproteins die gleiche Funktion, wie die vorgeschlagenen Protein-E Oligomerisierungsstrukturen einnehmen könnte.

3.3. Konstruktion von Plasmid pSB86-6: Einfluß von Protein-E Domäne 2 auf den funktionellen Zustand des E'- β -Gal-Fusionsproteins

Plasmid pSB85-3 (vergl. Ergebnisteil A: Punkt 2.2.) codiert für ein E'- β -Gal-Fusionsprotein, das Protein-E Domäne 1 beinhaltet. In Plasmid pSB85-3 (Abb.10) sind die ersten 30 Codons von Gen E mit dem 9. Codon des lacZ Gens fusioniert. Die Expression des E30'-lacZ Hybridgens, das der Kontrolle des lac Promotors untersteht, führte nicht zur Lyse von *E. coli*. Auch zeigten Plasmid pSB85-3 Rezipienten unter induzierten Bedingungen (in Gegenwart von IPTG) keinen meßbaren Einfluß auf das Zellwachstum. Es war einerseits denkbar, daß Protein-E Domäne 1 zur Lyseinduktion nicht ausreicht. Andererseits war es möglich, daß das Lysepotential des E30'- β -Gal-Fusionsproteins gering war und deshalb die schwache Expression des E30'-lacZ Hybridgens (vergl. Tab.4) zur Lyseinduktion nicht genügte.

Deshalb wurde das E30'-lacZ Gen zur Expressionssteigerung unter Lambda pL kloniert. Aus Plasmid pSB85-3 (Abb.10A) wurde ein 6,5 kb EcoRI/SalI Fragment isoliert. Dieses Fragment trägt den lac Promotor, die Translationsinitiationssignale sowie die ersten 30 5'Codons von Gen E, das lacZ und lacY Gen. Das 6,5 kb EcoRI/SalI Fragment wurde gerichtet in die EcoRI und SalI

Einzelschnittstellen von Plasmid pLc236 (Remaut et al. 1981) ligiert. Nach Transformation in *E. coli* pop2135, Selektion auf Amp Platten bei 28 C und Plasmid DNA Isolation wurde nach Plasmiden mit größerem Molekulargewicht gesucht.

Nach Isolation rekombinanter Plasmide wurde die Insertion des 6,5 kb Fragmentes durch EcoRI/SalI Verdau (Abb.36) bestätigt. In Abbildung 35 ist das konstruierte Plasmid pSB86-6

(Größe: 10,7 kb) schematisch dargestellt.



Abb.35: Schematische Darstellung von Plasmid pSB86-6

Die Transkriptionsrichtungen von Lambda pL (pL) und lac Promotor (lac PO) sind durch Pfeile angegeben. E30'-lacZ bezeichnet das Hybriden zwischen den ersten 30 N-terminalen Codons von Gen E und dem 9. Codon des lacZ Gens. Die DNA Sequenz zwischen Lambda pL spezifischem m-RNA Startpunkt und lac Promotor spezifischem m-RNA Startpunkt umfasst 241 Nukleotide. Die Länge der Nukleotidsequenz zwischen Lambda pL und Gen E Startcodon beträgt 389 Nukleotide. Das Plasmid hat eine Größe von 10,7 kb.

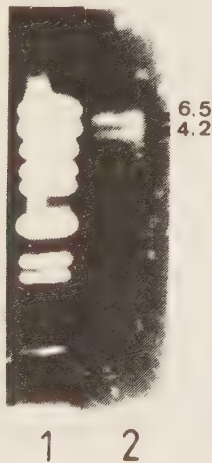


Abb.36: Restriktionsanalyse von Plasmid pSB86-6

Spur 1: Markerfragmente (L-DNA/EcoRV: 6400; 5200; 4200; 3500; 3000; 2100; 1550; 1350; 820; 580; 560)
 Spur 2: pSB86-6: EcoRI/SalI
 Der EcoRI/SalI Verdau von Plasmid pSB86-6 ergab nach Agarosegelelektrophorese (0,7%) ein 4,2 kb Fragment (entspricht Ausgangsvektor pLc236) und ein 6,5 kb Fragment (entspricht EcoRI/SalI Fragment aus pSB85-3).

3.3.1. Lysepotential des Plasmid pSB86-6 codierten Protein-E spezifischen Fusionsproteins

Die Expression des E30'-lacZ Hybridgens von Plasmid pSB86-6 hatte keine lytische Wirkung auf E. coli pop2135(pSB85-6) (Abb.37). Jedoch zeigte die stärkere Expression des Hybridgens von Plasmid pSB86-6 gegenüber der Expression von Plasmid pSB85-3 Einfluß auf das Zellwachstum.

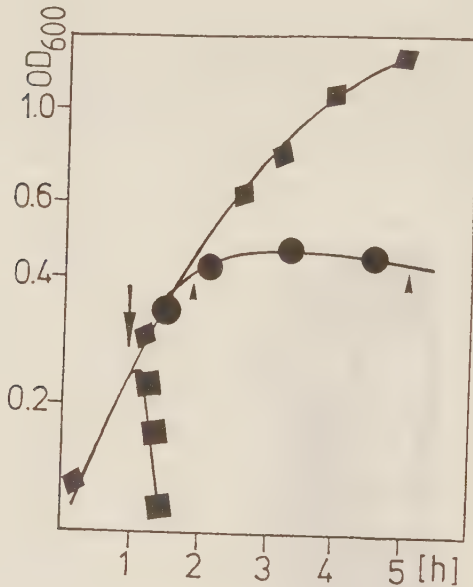


Abb.37: Expression des E30'-lacZ Hybridgens von Plasmid pSB86-6

Zur Expression von Gen E30'-lacZ von pSB86-6 wurde E. coli pop2135(pSB86-6) unter selektiven Bedingungen bei 28 C angezogen. Bei OD 600 von 0,25 wurden Lambda pL und lac Promotor durch Temperaturerhöhung auf 42 C bzw. durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 5 mM) induziert (großer Pfeil). (●—●) Wachstum von pop2135(pSB86-6) bei 42 C in Gegenwart von IPTG. (◆—◆) Wachstum von pop2135(pSB86-6) bei 28 C ohne IPTG. Als Vergleich ist die Expression von Gen E in pop2135(pSB12) (■—■) dargestellt. Die kleinen Pfeile geben die beiden Zeitpunkte der cfu Bestimmung an.

Die Expression des E30'-lacZ Gens unter der Kontrolle von Lambda pL von Plasmid pSB86-6 führte 75 Minuten nach Induktion (bei OD 600 von 0,25) durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 5mM) und Temperaturerhöhung auf 42 C zum Wachstumsstillstand (Abb.37). Die Bestimmung der Lebendkeimzahl nach Induktion der Gen E30'-lacZ Expression von Plasmid pSB86-6 ergab am Uebergang (OD 600 von 0,4) von der exponentiellen Wachstumsphase (Abb.37) in die stationäre Wachstumsphase eine cfu von 1×10^8 . 4 Stunden nach Expression des E30'- β -Gal Fusionsproteins von Plasmid pSB86-6 ging die cfu auf 1×10^4 herunter.

Die letale Wirkung des E30'- β -Gal-Fusionsproteins zeigte, daß Protein-E Domäne 1 die Funktion eines Membranankers in Protein-E einnimmt. Andererseits ist anzunehmen, daß die Oligomerisierungsstruktur der β -Galaktosidase im E30'- β -Gal-Fusionsprotein die gleiche Funktion einnimmt, wie die Domänen 3 oder 3 und 4 in Protein-E. Ferner konnte in diesen Fusionsstudien nicht ausgeschlossen werden, daß auch Protein-E Domäne 2 an der angenommenen Oligomerisierung von Protein-E beteiligt sein kann. Die letale Wirkung des E30'- β -Gal-Hybridproteins unterstützte das vorgeschlagene Modell der Protein-E induzierten Lyse von E. coli, da diese höchstwahrscheinlich auf Porenbildung in der inneren Membran beruht. Die Bildung einer Pore in der cytoplasmatischen Membran führt zum Zusammenbruch des Membranpotentials und ist damit für die Zelle letal.

C. Protein-E spezifische Antikörper

Zum Nachweis und zur Reinigung von Protein-E wurden Protein-E spezifische Antikörper hergestellt. Darüber hinaus sollten mit Hilfe der Antikörper mögliche Protein-E Oligomere nachgewiesen werden, um den vorgeschlagenen molekularen Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse zu bestätigen.

Zur Gewinnung Protein-E spezifischer Antikörper wurden synthetische Peptide aus der Aminosäuresequenz von Protein-E und ein β -Gal-E'-Fusionsprotein eingesetzt.

1. Konstruktion eines lacZ-E' Hybridgens und Reinigung des entsprechenden Fusionsproteins

Der C-Terminus von Protein-E ist überwiegend hydrophil und besitzt eine höhere Oberflächenwahrscheinlichkeit (Abb.30; Tab.5) als der N-Terminus. Dies ließ erwarten, daß dieser Protein-E Anteil antigene Determinanten trägt. Aufgrund der Strukturuntersuchungen und der Kenntnis über funktionelle Domänen von Protein-E wurden die letzten 40 Codons von Gen E mit dem lacZ Gen in Plasmid pUR290 (Rüther und Müller-Hill 1983) fusioniert. Da der funktionelle Teil von Protein-E im N-terminalen Bereich liegt, war von diesem Protein-E Anteil keine lytische Wirkung auf E. coli zu erwarten. Ferner sind β -Gal-Hybridproteine stabil und leicht zu reinigen (Ullmann 1984).

1.1. Konstruktion von Plasmid pSB10

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB10 ist in Abbildung 38 dargestellt. Zur Isolierung der DNA Region von PhiX174, die den letzten 40 Codons von Gen E entsprach, wurde Plasmid pUH12 mit EcoRI verdaut und das 1011er EcoRI Fragment (vergl. Konstruktion von Plasmid pSB12 in Abb.3) isoliert. Das 1011er EcoRI Fragment wurde anschließend mit TaqI nachverdaut und ein 404er TaqI Fragment (entsprach Nukleotid 721-1125 der PhiX174 DNA Sequenz) isoliert. Das 404er TaqI Fragment codiert für die letzten 40 Codons von Gen E, Gen J und einen Teil von Gen F.

Abb.38: Konstruktion von Plasmid pSB10

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB10 ist im Text dargestellt. PhiX174 DNA Sequenzen sind als offene Balken eingezeichnet. E' bezeichnet die letzten 40 Codons von Gen E. Die Transkriptionsrichtung des lac Promotors (lacPO) ist jeweils durch Pfeile angegeben.

Symbole für Restriktionsenzyme: $\diamond$ AccI; $\bullet$ BamHI; $\triangle$ EcoRI;

$\odot$ HindII; $\oplus$ HindIII; $\square$ PstI; $\diamond$ SalI; ∇ TaqI;

Die Schnittstellen der Plasmide pUR222 und pUR290 repräsentieren mit Ausnahme der EcoRI Schnittstelle in Plasmid pUR290 und der TaqI Schnittstelle in Plasmid pUR222 Einzelschnittstellen.

Z symbolisiert das lacZ Gen, Z-E' das Hybridgen zwischen lacZ und Gen E'. Die Balken a und b in pSB10 geben die zur Sequenzierung verwendeten Fragmente an.

Im Anschluß wurde das 404er TaqI Fragment in die AccI Einzelschnittstelle von Plasmid pUR222 (Rüther et al. 1981) subkloniert. Nach Ligation, Transformation in *E. coli* F⁻z⁻ΔM15 und Selektion auf Amp Platten wurde Plasmid DNA isoliert. Die Bestimmung der Insertionsrichtung des 404er TaqI Fragmentes erfolgte mit HaeIII (Abb.39).

In Plasmid pSB6 (Abb.38) war Gen E' mit seinem 5' Ende, in Plasmid pSB5 (Abb.38) mit seinem 3' Ende zum lac Promotor orientiert. Aus Plasmid pSB5 wurde Gen E' auf einem 418er PstI/BamHI Fragment reisoliert und gerichtet in die PstI/BamHI Einzelschnittstellen von Plasmid pUR290 ligiert. Die Transformation des Ligaseansatzes erfolgte wiederum in F⁻z⁻ΔM15. Nach Selektion auf Amp Platten und Plasmid DNA Isolation wurde die Insertion des 418er PstI/BamHI Fragmentes aus pSB5 durch BamHI/PstI Verdau bestätigt (Abb.39). In dem konstruierten lacZ-E' Hybridgen von Plasmid pSB10 ist Codon 1023 von Gen lacZ über einen "linker" von 9 Nukleotiden mit Codon 52 von Gen E fusioniert (Abb.40B).

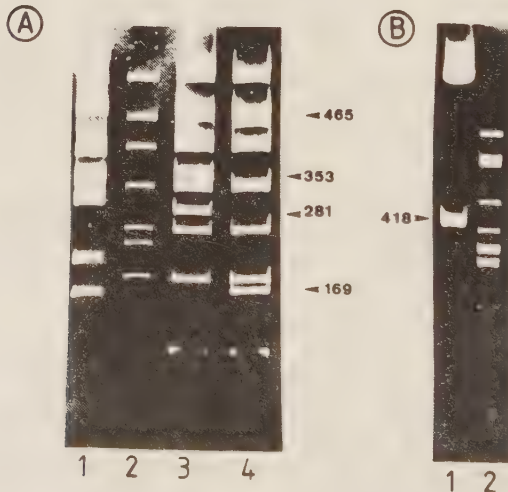


Abb.39: Restriktionsanalyse der Plasmide pSB5, pSB6 und pSB10

A: Restriktionskartierung von pSB5 und pSB6 mit HaeIII

Das Restriktionsenzym HaeIII schneidet innerhalb der klonierten Gen E' Sequenz einmal. Dies ermöglichte die Bestimmung der Insertionsrichtung des 404er TaqI Fragmentes in beiden Plasmiden durch Größenvergleich der HaeIII Restriktionsfragmente. Die Größe der HaeIII Fragmente konnte mit Hilfe der bekannten DNA Sequenzen von PhiX174 und Plasmid pUR222 berechnet werden. Nach HaeIII Verdau der beiden Plasmide ergeben sich folgende Fragmente, die auf einem 6% PAA-Gel aufgetrennt wurden. Als Marker wurde HaeIII verdaute pUR222 DNA und HindII verdaute PhiX174 DNA eingesetzt.

Spur 1: PhiX174/HindII	Spur 2: pUR222/HaeIII	Spur 3: pSB5/HaeIII	Spur 4: pSB6/HaeIII
1057	587	587	587
770	457	457	→ 465
612	434	434	457
495	338	→ 353	434
392	267	338	338
345	230	→ 281	267
341	188	267	188
335	102	188	→ 169
297	80	102	102
291		80	80
210			
162			
79			

Die Fragmente, die sich in den Plasmiden pSB5 und pSB6 aufgrund der unterschiedlichen Orientierung zum lac Promotor ergeben, sind durch Pfeile markiert.

B: Nachweis des Gen E' Inserts in Plasmid pSB10

Plasmid pSB10 wurde mit PstI und BamHI verdaut und auf einem 6% PAA-Gel aufgetrennt:

Spur 1: Markerfragmente (PhiX 174/HindII: siehe Abb.43A)

Spur 2: pSB10 PstI/BamHI

Das 418er Fragmentes ist angegeben.

1.2. Bestätigung des lacZ-E' Uebergangs in Plasmid pSB10

Die DNA Sequenz des lacZ-E' Uebergangs in Plasmid pSB10 konnte aus den bekannten Sequenzdaten von PhiX174, Plasmid pUR222 und Plasmid pUR290 (Sanger et al. 1978; Rüther et al. 1981; Rüther und Müller-Hill 1983) zusammengestellt werden (Abb.40B). Da das β -Gal-E'-Fusionsprotein zur Immunisierung eingesetzt werden sollte, wurde der lacZ-E' Uebergang in Plasmid pSB10 durch Sequenzierung bestätigt. Damit sollte sichergestellt werden, daß die Gen E Sequenz im Leseraster mit Gen lacZ kloniert wurde. Aus Plasmid pSB10 wurde das 514er EcoRI Fragment (Abb.38: Balken a) isoliert, radioaktiv markiert und anschließend mit PstI nachgespalten. Nach Abtrennung des kleineren 40er EcoRI/PstI Fragmentes wurde das entstandene 474er EcoRI/TaqI Fragment (Abb.38: Balken b), das die letzten 17 Codons des lacZ Gens und das klonierte PhiX174 Fragment enthielt, der basenspezifischen Spaltung nach Maxam und Gilbert unterworfen. Die durch Sequenzierung von Plasmid pSB10 ermittelte DNA Sequenz des lacZ-E' Uebergangs (Abb.40A) stimmte mit der DNA Sequenz, die aus den bekannten Sequenzdaten zusammengestellt wurde (Abb.40B), überein. Die Leseraster der Gene lacZ und E' waren identisch.

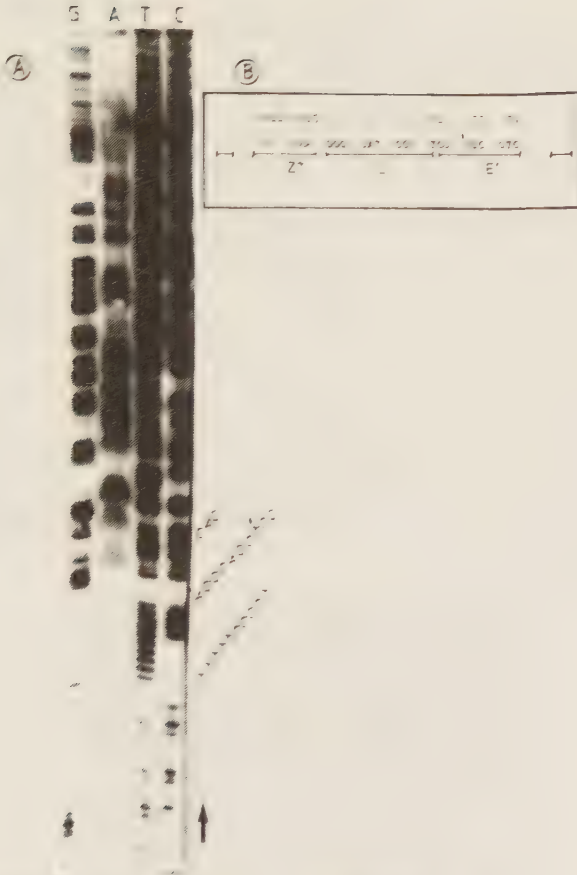


Abb.40: Sequenzierung des lac Z-E' Uebergangs in Plasmid pSB10

A: Autoradiogramm des Sequenzgels

Das 12Kbige Sequenzgel zeigt die Basensequenz von der EcoRI Schnittstelle bis zur PstI Schnittstelle in Plasmid pSB10 (Abb.38). Der große Pfeil bezeichnet die Leserichtung des Sequenzgels. Der kleine Pfeil gibt das erste PhiX174 spezifische Nukleotid an. G, A, T und C bezeichnen die 4 Nukleotid spezifizierten Basen. Da der 'Gegenstrang' radioaktiv markiert wurde, ist die ermittelte Basenabfolge zum klonogenen Strang (Abb.40B) komplementär.

B: Ausschnitt aus der DNA Sequenz von Plasmid pSB10 am lacZ-E' Uebergang

Die Zahlen oberhalb der Tripletts geben die Aminosäurepositionen der β-Galactosidase (Z-) und von Protein-E (E), an. Der Bereich zwischen beiden Genen ergibt sich aus den "Polylinker" Regionen (L) der Plasmide pSB5 und pUP200. Die Aminosäure Serin in Position 32 von Protein-E wurde durch die "linker" Sequenz von Plasmid pSB5 rekonstruiert.

1.3. Reinigung des β -Gal-E'-Hybridproteins durch Affinitätschromatographie

Zur Reinigung des β -Gal-E'-Fusionsproteins wurde *E. coli* PC1331 mit Plasmid pSB10 transformiert. Die Herstellung der β -Galaktosidase spezifischen Affinitätssäule und die Reinigung des Fusionsproteins sind im Methodenteil beschrieben. Nach Aufarbeitung der 500 ml Uebernachtkultur von *E. coli* PC1331(pSB10) konnte 2,15 mg reines β -Gal-E'-Fusionsprotein isoliert werden. Die gelelektrophoretische Analyse des Fusionsproteins (Abb.41: Spur 2) zeigte nach Coomassie Färbung nur eine Proteinbande, deren Molekulargewicht etwas höher als das der β -Galaktosidase lag. Im Gegensatz dazu traten bei käuflich erworbener β -Galaktosidase (Abb.41: Spur 1) zusätzliche Proteinbanden bei niedrigerem Molekulargewicht auf. Die hergestellte Affinitätssäule war für β -Galaktosidase äußerst spezifisch, da der Säulendurchlauf nach Applikation des Rohextraktes kein β -Gal-E'-Fusionsprotein aufwies (Abb.41: Spur 4).

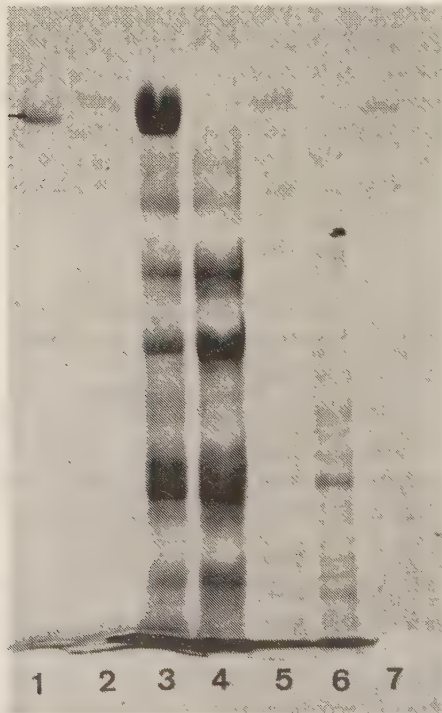


Abb.41: Reinigung des β -Gal-E'-Fusionsproteins

Die Proben wurden auf einem 7,5% PAA-Gel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 4 Stunden bei 180 V wurde das Gel einer Coomassie Färbung unterzogen.

- Spur 1: käuflicher β -Galaktosidasemarker (116 kd)
- Spur 2: gereinigtes β -Gal-E'-Fusionsprotein (10 ug)
- Spur 3: Rohextrakt von PC1331(pSB10) vor der Säulenapplikation
- Spur 4: Säulendurchlauf nach Applikation des Rohextrakts von PC1331(pSB10)
- Spur 5: Proteinmuster von PC1331(pSB10) (+IPTG)
- Spur 6: Proteinmuster von PC1331
- Spur 7: Proteinmuster von PC1331(pUR290) (+IPTG)

2. Synthetische Peptide mit Homologie zur Aminosäuresequenz von Protein-E

Die Aminosäuresequenz eines Proteins erlaubt die Vorhersage von möglichen antigenen Determinanten, die als kurze Peptide synthetisiert werden können (Hopp und Woods 1981; Eminl et al. 1985). Die synthetisch hergestellten Oligopeptide können anschließend zur Gewinnung von sequenzspezifischen Antipeptidantikörpern eingesetzt werden. Antipeptidantikörper wiederum ermöglichen die Identifikation (Sutcliffe et al. 1983) und Reinigung (Walter et al. 1982) von Proteinen. Die spezifische Reaktion der Antipeptidantikörper mit dem nativen Protein setzt voraus, daß die Konformation der dem Peptid entsprechenden Proteinregion während der Immunantwort durch das Peptidantigen nachgeahmt wird. Die Verwendung kurzer Peptide bietet den Vorteil, daß mehrere Konformationen eingenommen werden können und die entsprechende Proteinkonformation öfters nachgeahmt werden kann (Shinnick et al. 1983). Entscheidender zur Herstellung Protein reaktiver Antipeptidantikörper ist jedoch die Auswahl von Peptiden, die in exponierten hydrophilen und flexiblen Regionen auf der Proteinoberfläche liegen (Sutcliffe et al. 1982).

2.1. Auswahl der synthetischen Peptide aus der Aminosäuresequenz von Protein-E

Zur Vorhersage der möglichen antigenen Determinanten von Protein-E wurde sein Hydrophilizitätsprofil (Abb.42A) nach Hopp

und Woods (Hopp und Woods 1981) und sein Hydropathie-Profil (Abb.42B) nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle 1982) herangezogen. Dabei geht man von der Annahme aus, daß hydrophile Aminosäuren häufig an der Proteinoberfläche lokalisiert und daher für Antikörper zugänglich sind. Nach den Vorhersagen von Hopp und Woods (Hopp und Woods 1981) ist die immundominante Region eines Proteins somit in seinem Hydrophilizitätsmaximum lokalisiert. Sowohl nach dem Hydrophilizitätsprofil als auch nach dem Hydropathie-Profil von Protein-E liegt das Hydrophilizitätsmaximum des Proteins innerhalb der letzten 10 C-terminalen Aminosäuren. Die C-terminale Region von Protein-E zeigt außerdem eine hohe Oberflächenwahrscheinlichkeit und Flexibilität (Tab.5A und B), was wiederum für antigene Determinanten spricht (Tainer et al. 1984). Nach diesen Vorhersagen wurden zur Gewinnung von Antikörpern gegen Protein-E drei Peptide (Abb.42; Tab.6) aus der C-terminalen Region des Proteins (As. 78-91) ausgewählt und zur Synthese in Auftrag gegeben. Die Oligopeptide bestanden aus 7 (Peptid A und B) oder 8 (Peptid C) Aminosäuren und umfassten damit die Größe einer antigenen Determinante, die auf 6 Aminosäuren geschätzt wird (Atassi 1975).

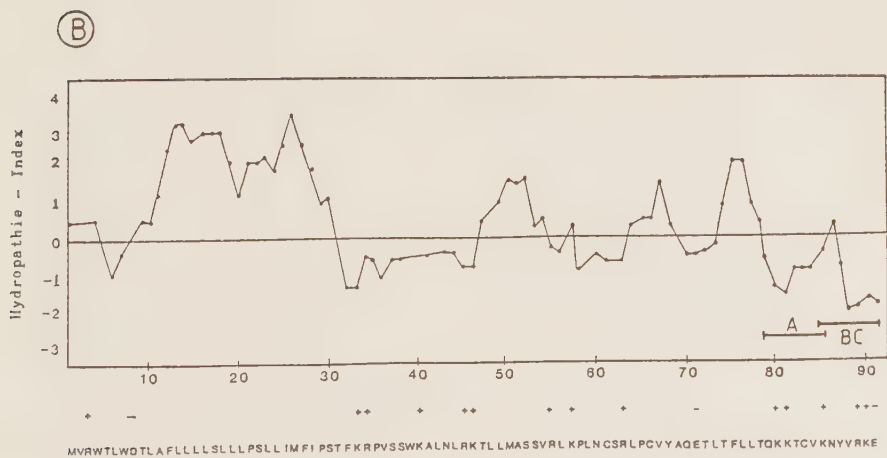
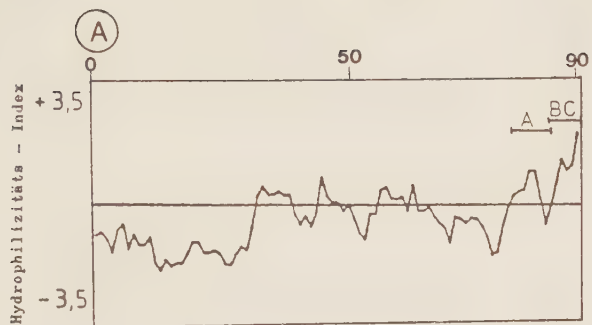
Abb.42: Hydropathie- und Hydrophilizitäts Profil von Protein-E

A: Hydrophilizitäts-Profil von Protein-E

Jeder Aminosäure wurde ein bestimmter Hydrophilizitätswert (Hopp und Woods 1981) zugeordnet. Die Hydrophilizitätswerte wurden über 5 benachbarte Aminosäuren gemittelt und gegen die Aminosäurepositionen (obere Skala) aufgetragen. Positive Werte geben hydrophile, negative Werte hydrophobe Regionen an. Die waagrechten Balken A, B und C repräsentieren die Protein-E Sequenzen, aus denen die 3 Oligopeptide ausgewählt wurden (vergl. Tab.6).

B: Hydropathie-Profil von Protein-E

Die Hydropathieindices (Kyte und Doolittle 1982) der einzelnen Aminosäuren wurden über 6 benachbarte Aminosäuren gemittelt und gegen die jeweilige Aminosäureposition (untere Skala) in der Protein-E Sequenz aufgetragen. Positive Werte geben hydrophobe, negative Werte hydrophile Regionen an. Die waagrechten Balken zeigen die Positionen der ausgewählten Oligopeptide im Protein (vergl. Tab.6). Die Aminosäuresequenz von Protein-E, in der die geladenen As eingetragen sind, ist im Einbuchstabencode (Fasman 1976) wiedergegeben.



Peptid	Protein-E Sequenz	Sequenz	Hydrophathie- index	Hydrophil- zitätsindex
A	80-85	Tyr-Lys-Lys- Thr-Cys-Val-Lys	-1,0	+0,60
B	85-91	Lys-Asn-Tyr-Val- Arg-Lys-Glu	-2.34	+1,12
C	85-91	Tyr-Lys-Asn-Phe- Val-Arg-Lys-Glu	-2,0	+0,67

Tab.6: Auswahl der synthetischen Peptide aus der C-terminalen Aminosäuresequenz von Protein-E

Die Tabelle zeigt die 3 käuflich erworbenen Peptide. Die Mittelwerte der Hydropathie- und Hydrophilizitätsindices der in den Peptiden vorkommenden Aminosäuren sind angegeben. Die Position der Peptide innerhalb der Protein-E Sequenz ist aus Abb.42 und Tab.5A zu entnehmen.

2.2. Kopplung der synthetischen Peptide an Trägerproteine

Kurze Peptide besitzen nur eine geringe Immunogenität. Erst die Kopplung an Trägerproteine ermöglicht die Auslösung einer starken humoralen Immunantwort (Katz 1980). Peptid A, B und C (Tab.6) wurden jeweils an die Trägerproteine Hämocyanin (KLH) und Thyroglobulin (TG) gekoppelt. Beide Proteine haben ein großes Molekulargewicht und stellen gute Antigene dar (Shinnick et al. 1983). Die Kopplung erfolgte mit Glutaraldehyd, Carbodiimid oder dem bifunktionellen Reagenz SPDP.

Bei der Reaktion von Glutaraldehyd mit Proteinen reagiert GA bevorzugt mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin (Reichlin 1980). In jedem verwendeten Peptid kommt die Aminosäure Lysin mehrmals vor. Eine weitere Kopplung war in den Peptiden A und C mit der Aminosäureseitengruppe von Arginin möglich. Durch die ungerichtete GA Kopplung konnte allerdings die intramolekulare Quervernetzung des jeweils eingesetzten Peptids nicht ausgeschlossen werden.

Carbodiimid fördert die Kondensierungsreaktion zwischen einer freien Carboxylgruppe und einer freien Aminogruppe. Die Kopplung der Peptide mit KLH oder TG durch EDC war somit über jede freie

Aminogruppe der Aminosäureseitenketten (Lys; Arg) oder Carboxylgruppe (Peptid C: Glu) innerhalb der Peptide A-C möglich. Da die Peptide nach Glutaraldehyd und Carbodiimid Kopplung über verschiedene Aminosäuren im jeweiligen Peptid an ihr Trägerprotein gebunden sein können, sind durch diese beiden Kopplungsmethoden unterschiedliche Präsentationen der Peptide auf der Proteinoberfläche möglich.

Die Verwendung des heterobifunktionellen Reagenz SPDP erlaubt die unidirektionale Kopplung zwischen einer Aminogruppe des Trägerproteins TG und der freien SH-Gruppe im Cystein von Peptid A (Tab.6). Dadurch war die einheitliche Präsentation des Peptidantigens auf der TG Oberfläche gewährleistet.

Peptid B und C wurden in einer 2 Stufenreaktion über ihre freien Aminogruppen durch SPDP mit TG gekoppelt. Auch in dieser Reaktion war die Kopplung zwischen Protein und jeweiligem Peptid über verschiedene Aminosäuren innerhalb der Peptide möglich.

2.2.1. Bestimmung der Kopplungsrate mit SPDP an Thyroglobulin gebundener Peptide

Die intermolekulare Disulfidbindung, die durch SPDP Kopplung (Carlsson et al. 1978) zwischen Peptid und Trägerprotein ausgebildet wird, kann durch reduzierende Reagenzien (β -Mercaptoethanol; DTT) gespalten werden. Diese Reduktion zerlegt das Protein-Peptidkonjugat wieder in seine Ausgangskomponenten. Diese können HPLC analytisch aufgetrennt und im Vergleich mit Eichsubstanzen (Peptid A-C; TG) quantitativ erfasst werden. Aus der ermittelten Peptid- und Proteinkonzentration kann das molekulare Verhältnis von Peptid und Trägerprotein, das der Kopplungsrate entspricht, errechnet werden. Nach Ausarbeitung der geeigneten Laufparameter, insbesondere Wahl der geeigneten Gelfiltrationssäule und des Laufpuffers, konnten für die Peptide A-C die Kopplungsraten an TG bestimmt werden (Tab.7).

Tab.7: Substitutionsgrad von TG mit den SPDP gekoppelten Peptiden

Peptid	Kopplungsrate
	TG : Peptid
A	1 : 33
B	1 : 25
C	1 : 1,3

Obwohl die SPDP Kopplung zwischen Peptid C und TG mehrmals durchgeführt wurde, konnte kein höherer Substitutionsgrad erreicht werden.

3. Peptid- und β -Gal-E'-Fusionsprotein spezifische Antikörper

Die jeweilige Immunantwort auf die verschiedenen Antigene ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Um die peptidspezifische Immunantwort von der Antwort gegen das eingesetzte Trägerprotein zu unterscheiden, wurden die verschiedenen Antipeptidantisera im ELISA gegen die entsprechenden freien Peptide getestet.

Tab.8: Peptid und Fusionsprotein spezifische Immunantwort

Peptid- antigen	Protein-E As. Sequ.	Kopplung durch an	Booster Injekt.	Antipeptid- titer (ELISA)	Serum
A	80 - 85	GA KLH	2	1:400	A1
A	" - "	GA TG	1	1:320	A2
A	" - "	SPDP TG	2	>1:6400	A3
B	85 - 91	GA KLH	3	>1:800	B1
B	" - "	SPDP TG	3	1:25	B2
C	85 - 91	GA KLH	4	1:25	C1
C	" - "	GA TG	2	-	C2
C	" - "	EDC TG	2	-	C3
C	" - "	SPDP TG	3	1:20	C4
β -Gal-E' 52 - 91	-- --		3	>1:25000 gegen β -Gal	D

Gegen Peptid A wurde der höchste Titer (>1:6400) nach unidirektionaler Kopplung mit SPDP an TG erreicht. Möglicherweise

ist die gerichtete Kopplung über die SH-Gruppe im Cystein von Peptid A und die damit einheitliche Präsentation des Peptides auf der Proteinoberfläche für die gute Immunantwort in Betracht zu ziehen. Nach Kopplung von Peptid A an TG oder KLH mit Glutaraldehyd (GA) als Kopplungsreagenz, wodurch sehr unterschiedliche Präsentationen von Peptid A auf der TG Oberfläche möglich werden, wurden hingegen nur Titer von 1:320 bzw. 1:400 (Tab.8) erzielt. Allerdings kann der niedrige Titer auch auf intramolekulare Quervernetzung des Peptides zurückzuführen sein. Das Beispiel zeigt ferner, daß das Trägerprotein keinen Einfluß auf den Anti-peptidantikörpertiter ausübt. Der Titer war nach GA Kopplung an KLH als auch an TG annähernd gleich.

Mit dem KLH-Peptid B Konjugat konnte ein Anti-peptidtitertiter gegen Peptid B >1:800 gewonnen werden. Wurde das gleiche Peptid mit SPDP an TG gebunden, so konnte kein nennenswerter Anti-peptidtitertiter (1:25) induziert werden. Dabei war der Substitutionsgrad von TG mit Peptid B (1:25), verglichen mit dem Substitutionsgrad von TG mit Peptid A (1:33), nur unwesentlich geringer. Die Kopplung über verschiedene freie Aminogruppen in Peptid B (Tab.6) konnte auch in diesem Fall zu unterschiedlicher Präsentation des Peptides auf der TG Oberfläche führen. Darüber hinaus kommt es nach der SPDP Kopplung von Peptid B an TG, ebenso wie bei der GA Kopplung, zur Modifikation der Aminogruppen von Aminosäureseitenketten im Peptid. Diese können für die Immunantwort wichtig sein (Shinnick et al. 1983). Möglicherweise trägt auch die Modifizierung der Aminogruppen zur schwachen Immunantwort gegen das TG-Peptid B Konjugat bei. Auch die im Vergleich zu dem SPDP gekoppelten TG-Peptid A Konjugat schwächere Immunantwort auf die GA gekoppelten Konjugate TG-A und KLH-A kann auf der Modifizierung der Aminogruppen der Aminosäureseitenketten beruhen.

Mit Peptid C konnte weder durch unterschiedliche Kopplungsmethoden noch durch Kopplung an KLH oder TG ein brauchbarer Anti-peptid-C-Antikörpertiter erzielt werden. Der Grund liegt wahrscheinlich einerseits im niedrigen Substitutionsgrad von TG mit Peptid C (1:1,3). Andererseits gingen auch hier alle durchgeführten Kopplungsarten mit der Modifizierung der Aminogruppen der Aminosäureseitenketten einher. Da kein gereinigtes Protein-E zur Verfügung stand, konnte die Immunantwort gegen das β -Gal-E'-Fusionsprotein nur indirekt durch

Ermittlung des Titors gegen gereinigte β -Galaktosidase im ELISA bestimmt werden. Nach Applikation des Fusionsproteins war ein rascher Anstieg des β -Galaktosidase Antikörpertiters in beiden verwendeten Kaninchen zu beobachten. Es wurde davon ausgegangen, daß mit dem Anstieg des Antikörpertiters gegen β -Galaktosidase auch eine Immunantwort gegen den Protein-E Anteil im β -Gal-E'-Fusionsprotein einherging.

3.1. Reaktivität von Anti-peptidantiserum A3 mit dem β -Gal-E'-Fusionsprotein

Für weitere Studien wurden in dieser Arbeit nur die Antiseren A3 und D (Tab.8) verwendet. Diese wiesen den höchsten Antikörpertiter gegen Peptid A (Tab.6) bzw. gegen das eingesetzte Fusionsprotein auf.

Im Kreuzreaktionstest zeigte Antiserum D im ELISA mit dem freien Peptid A kaum Reaktion (1:25). Dagegen wies Serum A3 gegen das Fusionsprotein einen Titer von 1:400 auf.

Durch Inkubation des Antiserums A3 mit dem β -Gal-E'-Fusionsprotein wurde die Affinität der Anti-peptidantikörper zu dem Protein-E Anteil im Fusionsprotein untersucht. Dazu wurde Antiserum A3 sowohl mit dem Fusionsprotein, als auch mit β -Galaktosidase inkubiert und der Titer freier Anti-peptidantikörper A3 gegen Peptid A nach Abzentrifugation im ELISA getestet. Nach Inkubation mit dem Fusionsprotein war der Elisa Titer von Antiserum A3 gegen Peptid A stark verringert (Abb.43). Dagegen wurde nach Inkubation mit β -Galaktosidase keine wesentliche Verringerung des ELISA Titer im Vergleich mit unbehandeltem Serum gegen Peptid A beobachtet (Abb.43). Das Experiment zeigte die Reaktion der Anti-peptidantikörper A3 mit dem Protein-E Anteil im Fusionsprotein und ließ eine spezifische Reaktion von Serum A3 mit Protein-E erwarten.

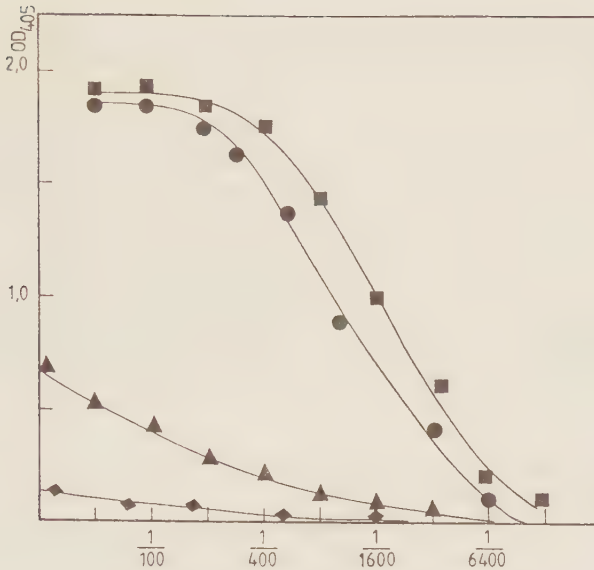


Abb.43: Reaktion der Anti-peptidantikörper A3 mit dem B-Gal-E'-Fusionsprotein

Antiserum A3 (Titer: >1:6400) wurde in Borat Saline, die 1 mg BSA/ml enthielt, 1:12,5 verdünnt (200 μ l) und mit 50 μ g B-Gal-E'-Fusionsprotein (▲▲) oder 50 μ g B-Galaktosidase (●●), die jeweils in Borat Saline resuspendiert waren, in einem Gesamtvolumen von 400 μ l über Nacht bei 4 C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden anschließend bei 100000 g in der Ultrazentrifuge (30 min) sedimentiert und Verdünnungen der Ueberstände im Vergleich zu entsprechenden Verdünnungen des nicht adsorbierten Antiserums A3 (■■) im ELISA gegen das freie Peptid A getestet. (◆◆) zeigt die Reaktion des Präimmunserums im ELISA mit Peptid A.

4. Reaktivität der Antikörper mit Protein-E

Zum Nachweis der Reaktivität der Anti-peptidantikörper A3 und des anti B-Gal-E' Antiserums mit Protein-E wurde Gen E in E. coli K12 Δ HI Δ trp(pSB12), pop2135(pSB12) und DS410(pcI857,pSB12) exprimiert und die Gesamtzellproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Sowohl nach Verwendung von ungereinigten Antiseren A3 und D (Tab.8), als auch nach Verwendung von affinitätschromatographisch gereinigten Anti-peptidantikörper A3 bzw. DEAE gereinigtem

Antiserum D war kein Nachweis für Protein-E im Immunoblot zu erbringen.

Protein-E wies nach Expression von Plasmid pSB12 eine geringe intrazelluläre Konzentration auf (vergl. Ergebnisteil A: Punkt 1.3.2. und 1.3.3.). Es wurde daher vermutet, daß im Immunoblot die Protein-E Konzentration der verwendeten Proben zu gering war. Das Detektionslimit der immunologischen Nachweisverfahren liegt bei ungefähr 10-20 ng Protein (Müller-Esterl und Vogel 1985). Da Protein-E ein Membranprotein darstellt (Bläsi et al. 1983), wurde die Membranfraktion von *E. coli* pop2135(pSB12) nach Gen E Expression isoliert. Nach Solubilisierung der Membranproteine sollte durch Immunadsorption eine spezifische Anreicherung von Protein-E durchgeführt werden.

4.1. Immunadsorption von Protein-E an immobilisierten Antipeptidantikörper A3

Zur Immunadsorption wurde das Antipeptidantiserum A3 (Titer gegen Peptid A: >1:6400) zunächst über DEAE Cellulose gereinigt.

Anschließend wurden aus der IgG Fraktion durch Affinitätschromatographie an einer Thiopropyl-Sepharose-6b-Peptid A Säule Peptid A spezifische Antikörper gewonnen. Nach diesen Reinigungsschritten lag der Titer der gereinigten Antipeptidantikörper A3 im ELISA gegen freies Peptid A bei >1:6400. Diese Antipeptidantikörper A3 wurden an aktivierter Sepharose 4b immobilisiert. Die Reinigung der Antipeptidantikörper A3 und ihre Kopplung an Sepharose ist im Methodenteil beschrieben.

Die Isolierung Protein-E haltiger Membranen erfolgte aus *E. coli* pop2135(pSB12). Zum eindeutigen Nachweis von Protein-E wurde die Membranfraktion von *E. coli* pop2135(pSB22), in der kein Protein-E vorkommt, als Kontrolle eingesetzt. *E. coli* pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) wurden jeweils in 1 l LB-Medium unter Selektionsbedingungen bei 28 C bis zur OD 600 von 0,4 angezogen und anschließend 4 Stunden bei 42 C zur Gen E Expression von Plasmid pSB12 weiterinkubiert. Gleichzeitig mit der Temperaturerhöhung auf 42 C wurde Magnesiumsulfat (Endkonzentration: 50 mM) zur Verzögerung der Protein-E Lyse (Lubitz et al. 1984a) zugegeben. Nach der Zellernte wurden die Membranfraktionen aus beiden Ansätzen isoliert. Die Solubilisierung der Membranfraktionen mit Dodecyl- β -D-maltosid,

die Immunadsorption der Membranproteine an aktivierte Sepharose 4b gebundene Anti-peptidantikörper A3 und die Elution der adsorbierten Proteine ist im Methodenteil Punkt 16 detailliert beschrieben. Nach Dialyse und Lyophilisierung wurden die Präluat- und Eluatfraktionen der immunadsorbierten Membranproteine von *E. coli* pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) gelelektrophoretisch analysiert.

4.1.1. Gelelektrophoretischer Nachweis von Protein-E nach Immunadsorption

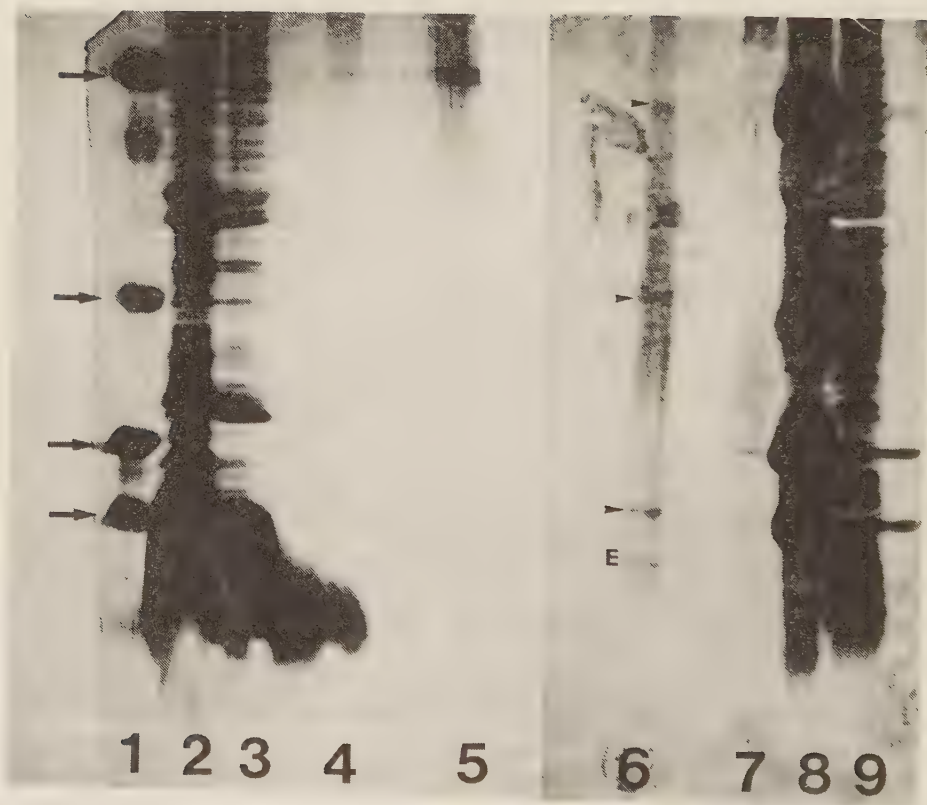
Die Abbildung 44 zeigt die Auftrennung der immunadsorbierten Membranproteine von *E. coli* pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) in der 15-23,5% SDS-PAGE nach Silberfärbung.

In der Eluatfraktion der immunadsorbierten Membranproteine von *E. coli* pop2135(pSB12) (Abb.44: Spur 6) trat ein Protein auf, dessen Molekulargewicht bei ungefähr 10 kd lag und mit dem Molekulargewicht von Protein-E übereinstimmte.

In der Eluatfraktion der Membranproteine von *E. coli* pop2135(pSB22) (Kontrolle) war diese Proteinbande nicht sichtbar (Abb.44: Spur 5).

Ebenso konnte die Proteinbande (Abb.44: Spur 6) nicht im Proteinmuster des Präluates der Membranproteine von pop2135(pSB12) nachgewiesen werden. Die Elution der Proteinbande erfolgte damit Natriumrhodanid spezifisch. Dies weist auf die Spezifität der immobilisierten Antikörper A3 für das Protein hin. Es wurde daher vermutet, daß das eluierte Protein (Abb.44: Spur 6) mit Protein-E identisch war.

Darüber hinaus waren im Proteinmuster der Eluatfraktion der Membranproteine von pop2135(pSB12) weitere Proteine (Abb.44: Spur 6) mit einem höheren Molekulargewicht als Protein-E sichtbar, die nicht in der Präluatfraktion des gleichen Ansatzes (Abb.44: Spur 7) auftraten.



**Abb.44: Gelelektrophoretischer Nachweis von Protein-E
nach Immunadsorption**

Nach der Immunadsorption der Membranproteine von *E. coli* pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) wurden die eluierten Proteine auf einem 15-23,5% PAA-Gel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Spur 1: Proteinmarker: Ovalbumin: 45 kd; Chymotrypsin: 25 kd;
Myoglobin: 17 kd; Cytochrom C: 12,3 kd;

Spur 2: Membranfraktion von pop2135(pSB22)

Spur 3: Säulendurchlauf der solubilisierten Membranfraktion
von pop2135(pSB22)

Spur 4: Präeluat der Membranfraktion von pop2135(pSB22)

Spur 5: Eluat der Membranfraktion von pop2135(pSB22)

Spur 6: Eluat der Membranfraktion von pop2135(pSB12)

Spur 7: Präeluat der Membranfraktion von pop2135(pSB12)

Spur 8: Proteinmarker (vergl. Spur 1)

Spur 9: Säulendurchlauf der solubilisierten Membranfraktion
von *E. coli* pop2135(pSB12)

Die großen Pfeile (➡) geben die Molekulargewichtspositionen der verwendeten Proteinmarker an. Die Position des eluierten E-Proteins (E) ist in Spur 6 gezeigt. Weitere immunadsorbierte Membranproteine von pop2135(pSB12) sind in der Eluatfraktion (Spur 6) mit kleinen Pfeilen (▶) markiert. In Spur 2 wurden 300 ug, in Spur 3 und 9 wurden jeweils 250 ug Protein aufgetragen. In der Eluat- und der Präeluatfraktion von pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) war nach Dialyse und Gefriertrocknung fast kein Protein sichtbar. Die eluierten Fraktionen von pop2135(pSB12) und pop2135(pSB22) wurden deshalb in je 60 ul Protein Probepuffer aufgenommen und jeweils (Spur 4-7) 20 ul auf das Gel aufgetragen.

4.1.2. Nachweis von Protein-E mit anti β -Gal-E' Antiserum

Zum Nachweis der Identität des immunadsorbierten Proteins (Abb.44: Spur 6) mit Protein-E wurde anti β -Gal-E' Antiserum (Tab.8: Serum D) eingesetzt. Die Eluatfraktion und die Präeluatfraktion der immunadsorbierten Membranproteine von *E. coli* pop2135(pSB12) (Abb.44: Spur 6 und 7), sowie der Säulendurchlauf der Membranfraktion von pop2135(pSB12) (Abb.44: Spur 9) wurden in der 15-23,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und der Immunoblot mit DEAE gereinigtem Antiserum D inkubiert. Das immunadsorbierte Membranprotein von pop2135(pSB12), das nach Silberfärbung bei einem Molekulargewicht von ungefähr 10 kD sichtbar war (Abb.44: Spur 6), wurde auch von den anti β -Gal-E' Antikörpern erkannt (Abb.45: Spur 1). Aufgrund der Reaktivität der beiden verschiedenen Protein-E Antisera mit dem immunadsorbierten Protein konnte die 10 kD Bande als Protein-E eindeutig identifiziert werden.

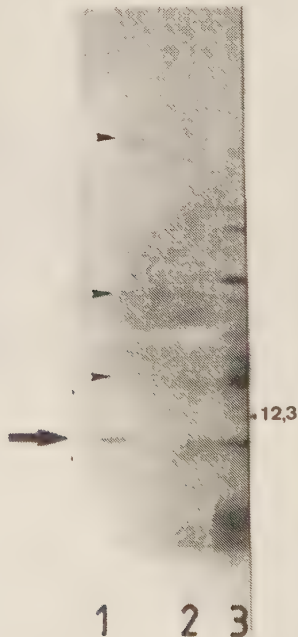


Abb.45: Reaktion des anti β -Gal-E' Antiserums mit den immunadsorbierten Membranproteinen von E. coli pop2135(pSB12) im Immunoblot

Nach Gelelektrophorese der Proteine im 15-23,5% PAA-Gel, Elektrotransfer der Proteine und Absättigung freier Bindungsstellen, wurde der Nitrocellulosefilter mit einer 1:150 Verdünnung des DEAE gereinigten Antiserums D (Tab.8) 3 Stunden bei 37 C inkubiert. Die Detektion der gebundenen anti- β -Gal-E' Antikörper erfolgte mit der Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode.

Spur 1: Eluatfraktion der Membranproteine von pop2135(pSB12) (entspricht Spur 6 der Abb.44)

Spur 2: Präeluatfraktion der Membranproteine von pop2135(pSB12) (entspricht Spur 7 der Abb.44)

Spur 3: Säulendurchlauf der Membranproteine von pop 2135(pSB12) (entspricht Spur 9 der Abb.44)

Die Position von Cytochrom C (12,3 kd) ist angegeben. Die Protein-E Position ist durch einen großen Pfeil ($\Rightarrow$) dargestellt. Protein-E Oligomere sind durch kleine Pfeile ($\blacktriangleright$) markiert. In Spur 1 und 2 wurden jeweils 40 μ l Eluatfraktion und 40 μ l Präeluatfraktion (vergl. Abb.44) und in Spur 3 250 μ g Protein des Säulendurchlaufs aufgetragen.

Da im Immunoblot gegenüber der gelelektrophoretischen Analyse (Abb.44) doppelte Konzentrationen der immunadsorbierten Membranproteine eingesetzt wurden, wurde die gleiche Proteinbande auch im Präeluat (Abb.45: Spur 2) sowie im Säulendurchlauf (Abb.45: Spur 3) erkannt. Da aus Kaninchen gewonnene Antikörper natürlicherweise mit E. coli Proteinen kreuzreagieren sind zusätzlich mehrere Membranproteine des Säulendurchlaufs (Abb.45: Spur 3) markiert.

In der Eluatfraktion der Membranproteine von pop2135(pSB12) konnten auch Proteine mit einem höheren Molekulargewicht als Protein-E gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Abb.44: Spur 6). Im Immunoblot wurden in dieser Eluatfraktion 2-3 weitere Proteine durch Antiserum D erkannt (Abb.45: Spur 1). Da der Protein-E Nachweis der 10 kd Bande eindeutig war, ist anzunehmen, daß es sich bei diesen weiteren Banden um Protein-E Oligomere handelt. Damit läßt sich das Modell der Protein-E Lyse, das von der Ausbildung einer E-spezifischen transmembranen Tunnelstruktur (Protein-E Oligomere) ausgeht und aufgrund der Untersuchung funktioneller Protein-E Domänen (Ergebnisteil B: Punkt 3.2.1. und 3.3.1.) anzunehmen war, auch strukturell belegen.

D. Konstruktion von Klonierungsvektoren mit Protein-E

Lysefunktion zum schonenden Aufschluß von E. coli

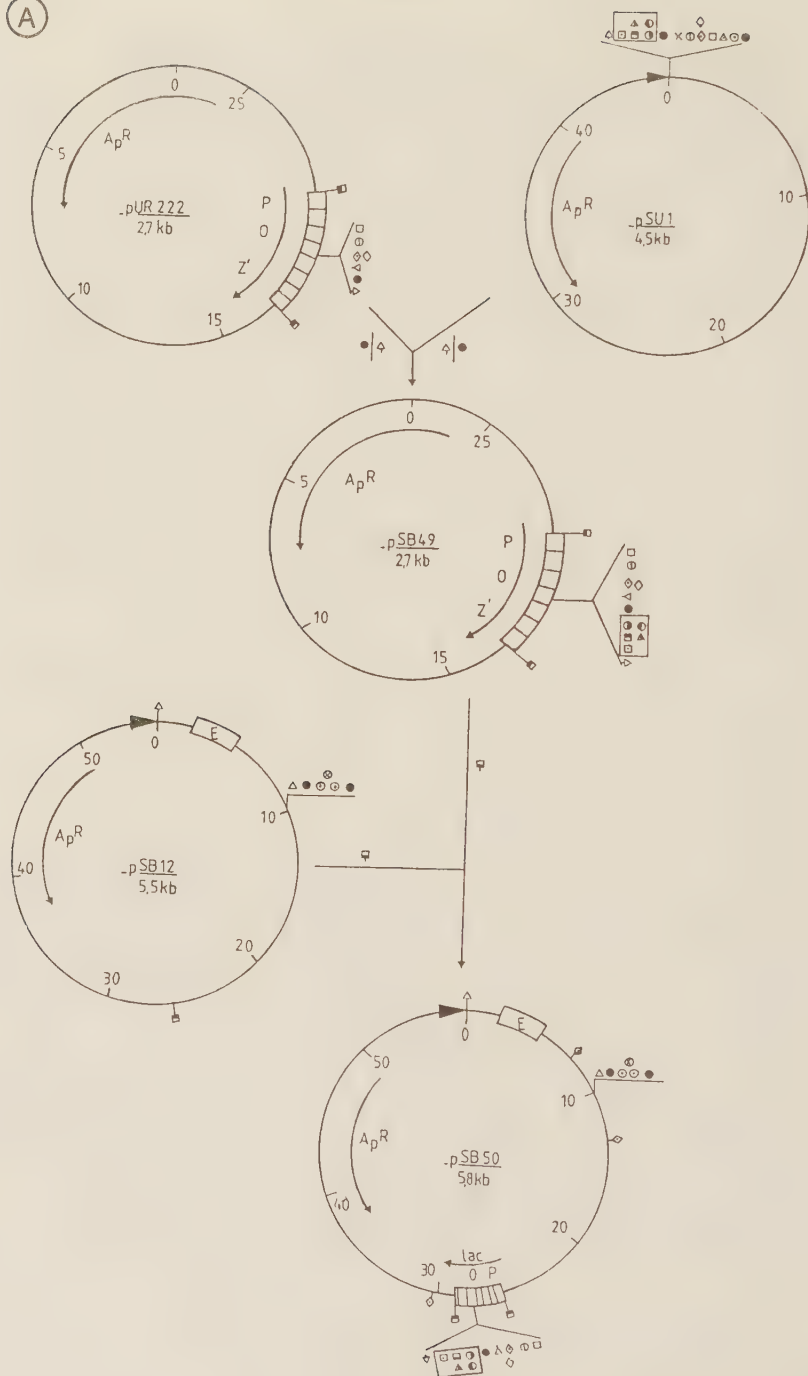
Die kontrollierte Expression von Gen E ermöglicht die biotechnologische Anwendung der Protein-E Lyse für die Freisetzung von gentechnologisch hergestellten Proteinen aus E. coli. Die endogen induzierte Lyse durch Protein-E bietet gegenüber exogenen Aufschlußmethoden verschiedene Vorteile. Nach Protein-E Lyse bleibt die morphologische Zellstruktur erhalten (Henrich und Plapp 1984). Dadurch können lysierte Zellen, die gegenüber exponentiell wachsenden Zellen lediglich optisch leer erscheinen, leicht filtriert und zentrifugiert werden. Die Abtrennung von Zellwandbestandteilen, wie sie bei enzymatischen Aufschlußmethoden auftreten, kann daher bei der Reinigung von Proteinen entfallen. Physikalische Methoden, wie Aufschluß durch Ultraschall, durch hydrodynamischen Druck oder durch Glasperlen sind mit Hitzeentwicklung und dem Auftreten mechanischer Scherkräfte verbunden, die empfindliche Proteine zerstören können. Außerdem sind diese Methoden aus technischen Gründen auf kleine Volumina beschränkt.

Zur Anwendung der Protein-E Lyse sollten Klonierungsvektoren mit Gen E Lysefunktion konstruiert werden, die gleichzeitig die Klonierung eines beliebigen Gens, dessen Produkt unter Protein-E Wirkung freigesetzt werden soll, hinter einen weiteren kontrollierbaren Promotor ermöglichen.

1. Konstruktion von Plasmid pSB50

Zur Konstruktion dieser Klonierungsvektoren wurde Plasmid pSB12 (Abb.3) als Ausgangsvektor benutzt. In Plasmid pSB12 sollte die lac Promotor-Operatorregion mit einer "Polylinkerregion" kloniert werden. Zur Klonierung von Genen mußte die "Polylinkerregion" Restriktionsschnittstellen aufweisen, die in dem rekombinanten Plasmid singulär waren. Ferner sollte "upstream" der "Polylinkerregion" eine Ribosomenbindungsstelle liegen, damit auch Gene, deren eigene Translationsinitiationssignale fehlen, translatiert werden können. Plasmid pSB12 besitzt eine singuläre PvuII Schnittstelle (Abb.46A), in die das lac Promotor-Operator Fragment aus Plasmid pUR222 (Abb.46A) mit einer "Polylinker" Region kloniert werden sollte. Alle Schnittstellen der "Polylinker" Region von Plasmid pUR222 kommen jedoch in

(A)



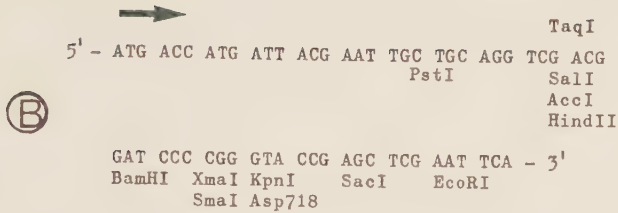


Abb.46: Konstruktion und "Polylinker" Region von Plasmid pSB50

A: Konstruktion von Plasmid pSB50

Der Konstruktionsweg von Plasmid pSB50 ist im Text beschrieben.

Symbole für Restriktionsenzyme: ◇ AccI; ▲ Asp718; ⊗ BalI;

● BamHI; △ EcoRI; ⊙ HindII; ⊙ HindIII; ■ KpnI; □ PstI;

■ PvuII; □ SacI; ◇ SalI; ● SmaI; ▲ SphI; × XbaI; ● XmaI;

Der "Polylinker" Anteil von Plasmid pSU1 ist eingerahmt.

Die eingerahmten Symbole für Restriktionsenzyme in Plasmid pSB50

bezeichnen Einzelschnittstellen. Die Transkriptions-

richtungen von Lambda pL (►) und lac Promotor (lacPO) sind

durch Pfeile, die Position von Gen E mit E angegeben. Die

Plasmidkarten sind in Abschnitte von 0,5 oder 1 kb unterteilt.

B: "Polylinker" Region in Plasmid pSB50 "downstream" vom lac Promotor

Die dargestellte Nukleotidsequenz umfasst die Region des "downstream" vom lac Promotor gelegenen Startcodons (eingerahmt) bis zur EcoRI Schnittstelle in Plasmid pSB50 (Abb.46A). Der Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung des lac Promotors an. Die eingerahmten Restriktionsenzyme repräsentieren Einzelschnittstellen in Plasmid pSB50.

Plasmid pSB12 ein- oder mehrmals vor. Zur Einführung weiterer Restriktionsstellen in die "Polylinker" Region von Plasmid pUR222 wurde Plasmid pSU1 (Schüller et al. 1985) benutzt.

Die Plasmide pSU1 und pUR222 wurden in einem Ansatz mit einem Ueberschuß von Plasmid pSU1 gegenüber Plasmid pUR222 von 10:1 mit BamHI und EcoRI verdaut, phenolisiert und religiert. Die Transformation des Ligaseansatzes erfolgte in *E. coli* K12 Δ HI Δ trp. Danach wurde von 120 Klonen Plasmid DNA isoliert. Zum Nachweis der Insertion des BamHI/EcoRI "Polylinker" Fragmentes aus Plasmid pSU1 (Abb.46A) in die BamHI/EcoRI Schnittstellen von Plasmid pUR222 wurden Plasmide mit der Größe von Plasmid pUR222 mit SmaI und KpnI (Abb.47A) verdaut.

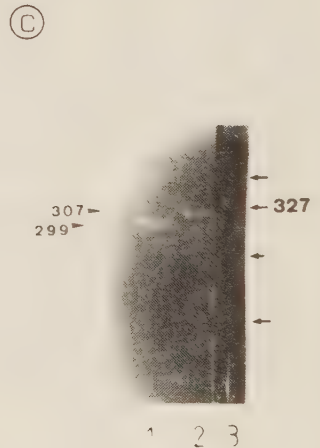
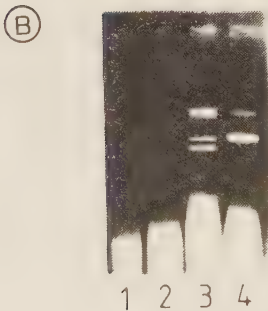
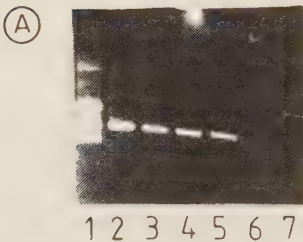


Abb.47: Restriktionsanalyse der Plasmide pSB49 und pSB50

A: Restriktionsanalyse von Plasmid pSB49

Auf das 0,8% Agarosegel wurde folgende DNA oder Restriktionsansätze aufgetragen:

Spur 1: unverdaute pUR222 DNA

Spur 2: pSB49/KpnI

Spur 3: pSB49/SmaI

Spur 4: pSB49/PstI

Spur 5: pSB49/SalI

Spur 6: pSB49/XbaI

Spur 7: pSB49/HindIII

B: Linearisierung von Plasmid pSB50 mit KpnI und SmaI

Auf das 0,8% Agarosegel wurden folgende Restriktionsansätze aufgetragen.

Spur 1: pSB12/SmaI

Spur 2: pSB12/KpnI

Spur 3: pSB50/SmaI

Spur 4: pSB50/KpnI

C: Bestimmung der Transkriptionsrichtung des lac Promotors in Plasmid pSB50

Durch die asymmetrische Lage der KpnI und AccI Schnittstellen in der "Polylinker" Region des inserierten 307er PvuII Fragmentes (Text) war es möglich die Insertionsrichtung durch KpnI/AccI Restriktionskartierung und Berechnung der Abstände zu benachbarten AccI Schnittstellen zu ermitteln. Folgende Fragmente wurden in Abhängigkeit von der Insertionsrichtung des 307er Fragmentes (Transkriptionsrichtung des lac Promotors im Uhrzeigersinn (I) und gegen den Uhrzeigersinn (II)) errechnet:

I	II
3365	3365
1607	1538
536	536
299	368

Nach KpnI/AccI und PvuII Verdau von Plasmid pSB50 wurden die Fragmente in einem 6% PAA-Gel aufgetrennt. Spur 1 (pSB50: KpnI/AccI) zeigt das 299er Fragment. Die Transkriptionsrichtung des lac Promotor erfolgt daher im Uhrzeigersinn.

Spur 2 (pSB50: PvuII) zeigt das in Plasmid pSB12 inserierte 307er PvuII Fragment. In Spur 3 sind Markerfragmente (PhiX174 DNA/TaqI: 2914; 1175; 404; 327; 231; 141; 87) aufgetragen, die mit kleinen Pfeilen markiert sind.

Diese Enzyme konnten nur in dem gesuchten rekombinanten Plasmid schneiden, da diese Schnittstellen in Plasmid pUR222 nicht vorhanden sind. Das gefundene rekombinante Plasmid wurde mit HindIII und XbaI nicht linearisiert (Abb.47A). Daher war nur der in Abbildung 46A umrandete Teil des "Polylinkers" von Plasmid

pSU1 im rekombinanten Plasmid inseriert. Die Linearisierung des rekombinanten Plasmides mit *Pst*I und *Sal*I (Abb.47A) bestätigte Plasmid pUR222 als Ausgangsvektor. Das gesuchte Plasmid mit dem "Polylinker" Anteil aus Plasmid pSU1 erhielt die Bezeichnung pSB49 (Abb.46A).

Es unterscheidet sich von Plasmid pUR222 durch 5 weitere Restriktionsschnittstellen (*Sma*I; *Xma*I; *Kpn*I; *Asp*718; *Sac*I), die in der "Polylinker" Region "downstream" vom lac Promotor liegen. Aus Plasmid pSB49 wurde ein 307er *Pvu*II Fragment isoliert, das den lac Promotor, das Translationsinitiationssignal des lacZ Gens und den "Polylinker" enthielt (Abb.46A). Das Fragment wurde in die *Pvu*II Einzelschnittstelle von Plasmid pSB12 ligiert und der Ligaseansatz in *E. coli* K12 Δ HI Δ trp transformiert. Nach Plasmid DNA Isolation wurde gelelektrophoretisch (0,6% Agarosegel) nach Plasmiden mit höherem Molekulargewicht gesucht. Diese wurden anschließend mit *Sma*I und *Kpn*I (Abb.47B) verdaut, um die Insertion des 307er Fragmentes in Plasmid pSB12, in dem keine *Kpn*I und *Sma*I Schnittstellen vorkommen, zu bestätigen. Das rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pSB50 (Abb.46A). Die Bestimmung der Transkriptionsrichtung des lac Promotors erfolgte durch *Kpn*I/*Acc*I Verdau (Abb.47C). Danach waren die Transkriptionsrichtungen von lac Promotor und Lambda pL in Plasmid pSB50 identisch. In beiden Fällen wird m-RNA im Uhrzeigersinn transkribiert (Abb.46A).

Abbildung 46B zeigt die "Polylinker" Region "downstream" vom lac Promotor in Plasmid pSB50. Zur Klonierung von Genen unter die Kontrolle des lac Promotors stehen 5 Einzelschnittstellen (*Sma*I; *Xma*I; *Kpn*I; *Asp*718; *Sac*I) zur Verfügung. Die lacZ spezifische Ribosomenbindungsstelle "upstream" der "Polylinker" Region kann zur Translation von Genen, deren eigene Ribosomenbindungsstelle fehlt, eingesetzt werden.

2. Konstruktion von Plasmid pSB51

Als Anwendungsbeispiel wurde das lacZ Gen unter der Kontrolle des lac Promotors in Plasmid pSB50 kloniert.

Das lacZ Gen wurde aus Plasmid pMC1403 (Abb.10A) auf einem 6,2 kb *Sma*I/*Sal*I Fragment isoliert, das zusätzlich Gen Y (lac Permease) und einen Teil des Gens A (Transacetylase) trägt. Das Fragment beinhaltet keine lacZ spezifische Ribosomenbindungsstelle.

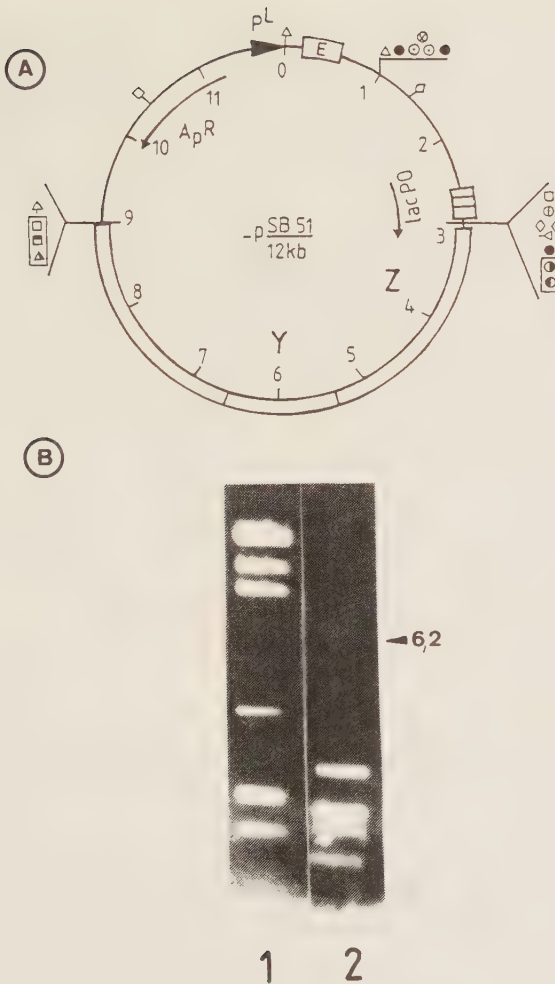


Abb.48: Darstellung und Restriktionsanalyse von Plasmid pSB51

A: Genkarte von Plasmid pSB51
pL und lacP0 bezeichnen Lambda pL und lac Promotor, deren Transkriptionsrichtungen durch Pfeile angegeben ist. Die Gene E (E), lacZ (Z) und lacY (Y) sind eingezeichnet. Das Plasmid ist in Abschnitte von 1 kb unterteilt.
Symbole für Restriktionsenzyme: $\diamond$ AccI; $\otimes$ BalI; $\bullet$ BamHI; $\triangle$ EcoRI; $\oplus$ HindIII; $\odot$ HindIII; $\blacksquare$ KpnI; $\square$ PstI; $\boxplus$ SacI; $\diamond$ SalI; ∇ TaqI; $\circ$ SmaI;
Die eingerahmten Symbole (SmaI; XmaI; SacI; KpnI; Asp718) repräsentieren Einzelschnittstellen.

B: Restriktionsanalyse von Plasmid pSB51
Plasmid pSB51 wurde mit PstI und EcoRI verdaut und die entstandenen Fragmente auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt.
Spur 1: Markerfragmente (P22 DNA/EcoRI: 19950; 9490; 7340; 4080; 2450; 1150; 1100; 860;
Spur 2: pSB51: PstI/EcoRI
Der EcoRI/PstI Verdau zeigt das klonierte 6,2 kb (lacZ; lacY) Fragment (Pfeil).

Nach Auffüllen der überstehenden Enden des Fragmentes und Vektors wurde das Fragment in das mit XmaI linearisierte Plasmid pSB50 ligiert. Die Verwendung der XmaI Schnittstelle ermöglichte die Insertion des lacZ Gens in seinem Leseraster. Nach Transformation in E. coli PC2169 wurden β -Galaktosidase positive Klone auf X-Gal-Amp Platten selektioniert. Nach Isolation von Plasmid DNA aus blauen Kolonien wurden die Plasmide mit PstI und EcoRI verdaut. Dadurch konnte die Insertion des 6,2 kb Fragmentes in Plasmid pSB50 bestätigt werden (Abb.48B). Das rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pSB51 (Abb.48A). Durch die Klonierung des lacZ Gens in die XmaI Schnittstelle von Plasmid pSB50 bleiben die SmaI und XmaI Schnittstellen in Plasmid pSB51 erhalten. Falls keine Fusionsproteine mit β -Galaktosidase entstehen, erlaubt die Klonierung in die SmaI oder XmaI Einzelschnittstellen von Plasmid pSB51 die positive Selektion der Klone auf X-Gal Platten. Die Bestimmung der Orientierung eines inserierten Gens zum lac Promotor ist durch die "upstream" gelegenen Schnittstellen der "Polylinker" Region möglich (Abb.48A).

3. Protein-E spezifische Freisetzung von β -Galaktosidase als Anwendungsbeispiel

Die Protein-E spezifische Freisetzung von β -Galaktosidase wurde in E. coli PC2169 untersucht. In diesem E. coli Stamm, der eine chromosomale Kopie des cI857 Repressorgens trägt, ist das gesamte lac Operon deletiert.

Die Gen E Expression wurde nach Wachstum von E. coli PC2169(pSB51) bei 28 C bis zur OD 600 von 0,5 durch Temperaturerhöhung auf 42 C induziert. Die Freisetzung der β -Galaktosidase, deren Expression konstitutiv erfolgte, wurde nach Eintritt der Protein-E induzierten Zellyse (20 min nach Induktion) über einen Zeitraum von 4 Stunden gemessen (Abb.49). Die Freisetzung der β -Galaktosidase erfolgte simultan mit dem Eintritt der Protein-E induzierten Lyse von E. coli PC2169(pSB51). Im weiteren Verlauf der Messung korrelierte die Zunahme der β -Galaktosidaseaktivität im Außenmedium mit der Abnahme der optischen Dichte der Zellkultur (Abb.49). Nach 3 Stunden war die optische Dichte der Kultur auf einen Wert von OD 600 von 0,24 abgefallen und die β -Galaktosidaseaktivität im Kulturmedium auf einen Wert von 178 units/mlxmin angestiegen. Da

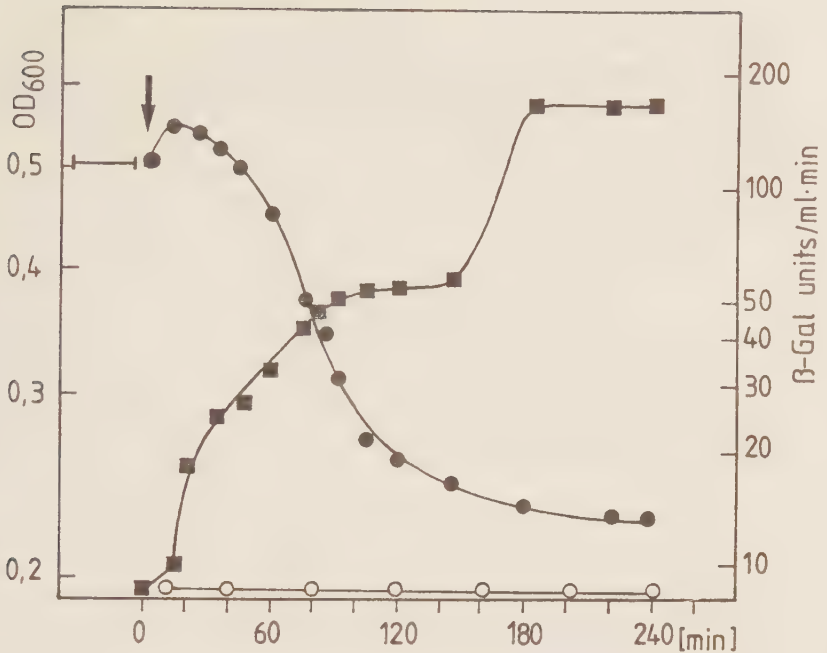


Abb.49: β-Galaktosidase Freisetzung nach Induktion der Gen E Expression in E. coli PC2169(pSB51)

E. coli PC2169(pSB51) wurde unter Selektionsbedingungen bei 28 C in LB-Medium angezogen (Balken). Bei OD 600 von 0,5 (Pfeil) erfolgte Temperaturerhöhung auf 42 C. Zu jedem Zeitpunkt, in dem der Lyseverlauf von E. coli PC2169(pSB51) (●-●) durch Messung der optischen Dichte ermittelt wurde, wurden 200 ul Kulturflüssigkeit entnommen, abzentrifugiert (15000 g) und die β-Galaktosidaseaktivität (■-■) im Kulturüberstand bestimmt. Zur Kontrolle wurde die β-Galaktosidaseaktivität im Kulturüberstand von E. coli PC2169(pSB51) (○-○) während des Wachstums bei 28 C gemessen.

die β-Galaktosidaseaktivität im Außenmedium und die optische Dichte von diesem Zeitpunkt an über 1 h konstant blieben (Abb.49), wurden keine weiteren Messungen durchgeführt. Kontrollzellen von E. coli PC2169(pSB51), die bei 28 C gezogen wurden (Gen E reprimiert), wiesen keine meßbare

β -Galaktosidaseaktivität im Kulturmedium auf (Abb.49). Diese Untersuchungen zeigten die Anwendung der konstruierten Plasmide pSB50 und pSB51 zur Klonierung von Genen und zur Freisetzung der entsprechenden Genprodukte.

V. DISKUSSION

In früheren Untersuchungen konnte Protein-E in Φ X174 infizierten Zellen (Pollock et al. 1978) oder nach Expression von Plasmid pUH12 (Henrich 1983a) nur mit großem Vorbehalt gegenüber dem Hintergrund zellulärer Proteine nachgewiesen werden. Um einen besseren Nachweis zu erzielen, wurde Plasmid pSB12 konstruiert, das gegenüber bisher vorhandenen Plasmiden eine erhebliche Steigerung der Gen E Expression erlaubte. Nach Expression von Plasmid pSB12 (Gen E wt Allel) konnte Protein-E in den Proteinmustern von *E. coli* K12 Δ HIAtrp(pSB12) und DS410(pcI857,pSB12) durch Vergleich mit den Proteinmustern entsprechender Zellen, die das Plasmid pSB22 (E am3 Allel) enthielten, eindeutig identifiziert werden. Auffällig war jedoch, daß Protein-E im Verhältnis zu anderen Proteinen nur in äußerst geringen Mengen gebildet wurde.

Wie im Ergebnisteil A unter Punkt 2.3. gezeigt werden konnte, werden zur Lyse von *E. coli* nur ungefähr 250-1200 Protein-E Moleküle benötigt. Die Klonierung der letalen Gen E Funktion unter die Kontrolle von Lambda pL war damit zugleich ein empfindliches Maß für die Reprimierbarkeit des Lambda pL durch den cI857 Repressor. Das cI857 Allel in *E. coli* K12 Δ HIAtrp oder pop2135 genügte, um die Expression von Gen E von Plasmid pSB12 effektiv genug zu reprimieren. Dagegen wurde Protein-D in den durchgeführten Gen D und Gen E Expressionsstudien von Plasmid pSB35 auch unter reprimierten Bedingungen (28 C) schwach exprimiert (Abb.18A). Da Gen D und Gen E überlappen ist anzunehmen, daß auch im Fall von pSB12 eine gleichstarke Hintergrund-Synthese Gen E spezifischer m-RNA unter reprimierten Bedingungen auftritt. Da in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, daß Gen D gegenüber Gen E unter gleichen Bedingungen ungefähr um den Faktor 10 stärker translatiert wird, kann man annehmen, daß eine kritische Protein-E Konzentration, die zur Zellyse ausreichen würde, nie erreicht wird.

Die Bestimmung der "Stärke" der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle ergab, daß Gen E gegenüber dem lacZ Gen eine äußerst "schwache" Ribosomenbindungsstelle besitzt (Tab.4). Aller Wahrscheinlichkeit nach stellt die schwache Ribosomenbindungsstelle von Gen E die wichtigste Kontrollfunktion der Gen E Expression auf translationaler Ebene dar und trägt

damit wesentlich zur Verhinderung der frühzeitigen Lyse nach Phageninfektion bei. Andererseits erklärt die schwache Gen E Translationsinitiation auch bei niedriger Hintergrundtranskription von Lambda pL das normale Wachstum von Plasmid pSB12 tragenden Zellen.

Die "Stärke" einer Ribosomenbindungsstelle kann durch Veränderung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno Sequenz und Startcodon oder durch Manipulation von "upstream" oder "downstream" der Translationsinitiationssequenz gelegener DNA Regionen beeinflusst werden. Der Einfluß von "downstream" des Startcodons gelegener Gensequenzen auf die Translationseffizienz, konnte nach Expression des lacZ Gens von translationalen Kontrollsignalen, die für die β -Interferon Synthese optimiert worden waren, nachgewiesen werden (Stanssens et al. 1985). Um solche Effekte auszuschließen, wurden in Plasmid pSB85-2 zusätzlich "upstream" und in Plasmid pSB85-3 zusätzlich "up- und "downstream" der Gen E Startsequenz gelegene PhiX174 DNA Squenzen kloniert. Somit konnte in den durchgeführten Experimenten die PhiX174 nahe Translationsinitiationssituation von Gen E erhalten werden. Der Einfluß von Gen E internen Sequenzen auf die Translationseffizienz des lacZ Gens konnte durch die leicht erhöhte β -Galaktosidaseaktivität nach Expression des lacZ Gens von Plasmid pSB85-3 gegenüber der Expression des lacZ Gens von Plasmid pSB85-2 gezeigt werden (Tab.4).

Wie nachgewiesen werden konnte, wird die Ribosomenbindungsstelle von Gen E nicht durch eine "hairpin" Struktur maskiert (Abb.13 und 14). Die schwache Translationsinitiation von Gen E kann damit nicht auf der Unzugänglichkeit der Gen E spezifischen Shine-Dalgarno Sequenz für Ribosomen beruhen.

Die Shine-Dalgarno Sequenzen von Gen E und Gen lacZ weisen in 4 Nukleotiden Komplementarität mit dem 3' Ende der 16s rRNA auf. Das, im Vergleich zur lacZ spezifischen Ribosomenbindungsstelle, schwache Translationsinitiationssignal von Gen E kann damit nicht durch verminderte Homologie zur 16s rRNA erklärt werden.

Möglicherweise tragen lokale m-RNA Tertiärstrukturen, welche die Translationseffizienz von einer Ribosomenbindungsstelle beeinflussen können (Stanssens et al. 1985), zur schwachen Translationsinitiation von der Gen E spezifischen Ribosomenbindungsstelle bei.

Zur Expressionssteigerung von Protein-E wurden im Rahmen dieser

Arbeit mehrere Ansätze zur Klonierung von Gen E unter die lacZ spezifische Ribosomenbindungsstelle unternommen (im Ergebnisteil nicht dargestellt). Obwohl dieses Ziel mit großem Zeitaufwand verfolgt wurde, konnte kein Plasmid gefunden werden, daß die Expression von Gen E in Abhängigkeit von der lacZ spezifischen Ribosomenbindungsstelle zuließ. Eine mögliche Erklärung bietet der bereits geschilderte Befund, daß nur 250-1200 Protein-E Moleküle zur Lyseinduktion benötigt werden. Diese Proteinkonzentration ist bei nicht zu unterdrückender Hintergrund-Expression von induzierbaren Promotoren leicht erreicht, wenn eine effektive Translation der transkribierten Gene möglich ist.

In Prokaryonten kann die proximale Translation eines Gens von einer polycistronischen m-RNA, auf der eine überlappende Genanordnung vorkommt, auf das distal gelegene Gen gegensätzliche Effekte haben. Die Translationseffizienz des distal gelegenen Gens kann entweder gesteigert oder verzögert werden. Eine positive (Schümperli et al. 1982) oder negative translationale Kopplung (Schottel et al. 1984; Berkhout et al. 1985) wurde für mehrere überlappende Genregionen beschrieben.

So ist beispielsweise die Expression der überlappenden Gene xis und int im Genom des Phagen Lambda, deren Produkte für die Excision und Integration von Lambda notwendig sind, translationell gekoppelt (Hoess et al. 1980; Davies et al. 1980). Das distal von Gen xis gelegene Gen int unterliegt während der Translation von Gen xis der negativen translationalen Kopplung.

Die simultane Translation von Gen D und E, die auf PhiX174 spezifischen m-RNA's überlappen, unterliegt keinem dieser Effekte. Der meßbare Lyseeintritt erfolgte sowohl nach Gen E Expression von Plasmid pSB12 (nur Gen E Expression), als auch von Plasmid pSB35 (Gen D und Gen E Expression) zum gleichen Zeitpunkt (Abb.17). Die kritische Protein-E Konzentration zur Initiation des Lyseprozesses wird also in beiden Fällen gleichschnell synthetisiert. Die leicht verzögerte Lyserate nach simultaner Expression der Gene D und E von Plasmid pSB35 zeigte im Gegensatz zur Gen E Expression von Plasmid pSB12 (Abb.17) nur eine leichte Andeutung translationaler Kopplung.

In früheren Untersuchungen wurde davon ausgegangen, daß die Kontrolle der Gen E Expression auf der Unzugänglichkeit der Gen E Ribosomenbindungsstelle während der Gen D Translation beruht (Barrell et al. 1976; Edlund und Ihler 1980). Die oben

aufgeführten Ergebnisse widersprechen dieser Annahme. Wie die Untersuchungen zeigten ist die Gen E spezifische Ribosomenbindungsstelle auch während der Kotranslation von Gen D für Ribosomen annähernd unbeeinflusst zugänglich. Es kann somit festgestellt werden, daß translationale Kopplung, wie von Berkhout et al. (1985) vermutet, kein generelles Phänomen in der Expression überlappender Gene darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Experimente zur Inhibition der Phagenlyse oder der Protein-E induzierten Lyse von *E. coli* mit Gen E spezifischer mic-RNA ("messenger-RNA-interfering complementary RNA") durchgeführt (im Ergebnisteil nicht dargestellt). Die Plasmide pSB3 (Abb.31) und pUH11 (Henrich et al. 1982a) ermöglichen die Synthese von RNA, die zur Gen E spezifischen m-RNA komplementär ist. Die gleichzeitige Synthese von mic-RNA, die zum 5' Ende von Gen E (Plasmid pSB3) bzw. zur vollständigen Gen E Sequenz (Plasmid pUH11) komplementär war, hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Phagentiter nach PhiX174 Infektion oder auf die Lyserate nach Gen E Expression von Plasmiden.

Im Phagengenom scheint eine Kontrolle der Gen E Expression über mic-RNA nicht vorzukommen. Sequenzanalysen der PhiX174 DNA ergaben keinen Promotor, der die Synthese von Gen E spezifischer mic-RNA initiieren könnte.

Z-DNA Strukturen können zur Beendigung der Transkription führen, da sie schwache Substrate für die RNA-Polymerase (Rich et al. 1984) darstellen. Im distalen Bereich von Gen E (Nukleotidposition: 763-776) kommt eine Z-DNA Struktur vor (Revet et al. 1984). Wie gezeigt, war die Expression des E30'-lacZ Hybridgens von Plasmid pSB85-3 und die Expression des lacZ Gens von Plasmid pSB85-2, denen diese Z-DNA Struktur fehlt, verglichen mit der Gen E Synthese in PhiX174 infizierten Zellen (Pollock et al. 1978) jedoch nicht erhöht. In der Kontrolle der Gen E Expression scheint diese Z-DNA Struktur somit keine Rolle zu spielen.

Eine funktionelle Beeinflussung der Protein-E induzierten Lyse könnte auf der Wirkung eines möglichen anti-Lyseproteins beruhen. Solch ein Mechanismus, der das "Timing" der Lyse beeinflussen würde, scheint durch Untersuchungen über die Auswirkungen von Mutationen in Gen K (Tessman et al. 1980; Gillam et al. 1985) bei PhiX174 möglich.

Im N-terminalen Bereich zeigen die Proteine K und E strukturelle Ähnlichkeit. In beiden Fällen ist der N-Terminus hydrophob. Die funktionelle und membranaffine Domäne von Protein-E liegt, wie gezeigt, im N-Terminus. Dies scheint auch für Protein-K zuzutreffen. Protein-K des Phagen G4 ist im N-Terminus stärker konserviert als im C-Terminus (Godson 1978), wodurch die wichtige Funktion dieser Domäne hervorgehoben wird.

Nach Expression von Gen K in Plasmid pSB150 tragenden Minizellen (Abb.23) konnte Protein-K sowohl in der cytoplasmatischen, als auch in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Der cytoplasmatische Nachweis von Protein-K kann auf seine hohe Syntheserate und sein niedriges Molekulargewicht zurückzuführen sein. Nach Studien von Randall (Randall 1983) wird das periplasmatische Ribose-Bindungsprotein bis zu 80% seines Molekulargewichtes synthetisiert, bevor die Insertion in die cytoplasmatische Membran und die Translokation in den periplasmatischen Raum einsetzt. Für das M13 "pro coat" Protein erfolgt die Insertion in die cytoplasmatische Membran posttranslational (Wickner und Lodish 1985). Die posttranslationale Insertion wäre auch für Protein-K denkbar, da das Protein nur aus 56 Aminosäuren besteht und während der Translation bis zu 35 Aminosäuren der wachsenden Polypeptidkette vom Ribosom überdeckt werden können (Wickner und Lodish 1985). Unter diesen Gesichtspunkten könnte das niedrige Molekulargewicht und die starke Expression von Protein-K die cotranslationale Insertion in die Cytoplasmamembran verhindern und zur Akkumulation von Protein-K im Cytoplasma führen.

Protein-K wirkt nach PhiX174 Infektion lyseverzögernd und führt zu einer erhöhten Zahl an Nachkommenphagen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Protein-K keinen Einfluß auf die Protein-E induzierte Lyse ausübt. Demnach kann die lyseverzögernde Wirkung von Protein-K nach PhiX174 Infektion nicht auf einer Interaktion der Proteine K und E beruhen.

Die Funktion von Protein-K bleibt damit unklar. Allerdings zeigen die PhiX174 und die Protein-E induzierte Lyse quantitative Unterschiede. So können E. coli Mutanten, die gegen Protein-E resistent sind, durch PhiX174 lysiert werden (G. Halfmann, pers. Mitteilung). Ebenso kommt es während der PhiX174 Lyse (Lubitz und Plapp 1980) zum Abbau von Murein, während infolge der Protein-E Lyse allein kein Mureinabbau feststellbar ist (A. Witte, pers.

Mitteilung). Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß das PhiX174 Protein-H einen Einfluß auf die Phagenlyse ausüben kann (Hutchison und Sinsheimer 1966; Sinsheimer 1968).

Aussagen über den Mechanismus der Protein-E induzierten Lyse, die in der vorliegenden Arbeit gemacht werden, beziehen sich nur auf die Plasmid codierte Lysefunktion. Struktur- und Funktionsbeziehungen von Protein-E wurden durch Fusionsanalysen untersucht, wobei die Funktionen der 4 verschiedenen Protein-E Domänen geklärt werden sollte.

Protein-E Fusionsstudien wurde auch von anderen Arbeitsgruppen (Maratea et al. 1985; Buckley und Hayashi 1986) durchgeführt, die die E-spezifische Lyse in den angeführten Arbeiten untersuchten. So wurde Gen E vom C-Terminus her verkürzt und die entsprechenden Gen E Deletionen mit dem lacZ Gen fusioniert. Alle Hybridproteine in denen die ersten 59, 64, 67, oder 74 N-terminalen Aminosäuren von Protein-E an β -Galaktosidase fusioniert wurden, verhielten sich lyse-positiv (Maratea et al. 1985). Die entsprechend verkürzten Protein-E Polypeptide allein waren hingegen lyse-negativ.

Ebenso wurden Genfusionen zwischen den ersten 29 Codons von Gen E und dem lacZ Gen sowie dem cat Gen beschrieben (Buckley und Hayashi 1986). Beide Fusionen ergaben letal wirkende Proteine, wobei das E29'- β -Gal-Fusionsprotein, verglichen mit dem E29'-cat-Fusionsprotein kaum Lyse induzierte. Sowohl β -Galaktosidase (Zipser 1963) als auch Chloramphenicolacetyltransferase (Shaw 1972) stellen im nativen Zustand Tetramere dar.

Ähnliche E-spezifische Fusionen mit anderen Genen, deren Genprodukte keine Oligomerisierungsstrukturen beinhalten, erwiesen sich trotz gleicher E-Anteile als lyse-negativ und hatten ebenso keinen letalen Effekt auf die Zellen (Schüller et al. 1985; Buckley und Hayashi 1986).

Diese Befunde unterstützen die im Ergebnisteil geäußerte Vermutung, daß es sich beim a' Anteil des konstruierten Fusionsproteins E'-a' (Abb.33) um eine Oligomerisierungsstruktur handelt. Das Lysepotential des Plasmid pSB4 kodierten E'-a' Fusionsproteins ist demnach nur auf die Oligomerisierungsstruktur des a' Anteils zurückzuführen. Bei der a' Sequenz handelte es sich um eine Zufallssequenz (außerhalb des Leserasters des Amp Gens). Damit zeigt das Lyse induzierende E'-a' Fusionsprotein

zugleich eine Strategie auf, durch funktionelle Ergänzung der Protein-E Domänen 1 und 2 zu lyse-positiven Strukturen, nach Oligomerisierungsstrukturen zu suchen. Das Auftreten von Oligomerisierungsstrukturen in den konstruierten Fusionsproteinen kann durch den einfachen Lysetest überprüft werden.

Die theoretisch vorhergesagte Membranaffinität von Protein-E Domäne 1 konnte durch die letale Wirkung des E30'- β -Gal-Fusionsproteins von Plasmid pSB86-6 experimentell bestätigt werden. Eine E23'- β -Gal Fusion zeigte keine letalen Effekte (Maratea et al. 1985) und weist damit auf die Notwendigkeit der Erhaltung von Protein-E Domäne 1 für die Verankerung in der Membran hin.

Das E29'-cat-Fusionsprotein (Buckley und Hayashi 1986), das lyse-positiv wirkte, wird aufgrund der hier aufgeführten Befunde und durch den Vergleich mit anderen beschriebenen lyse-positiven E-spezifischen Hybridproteinen (Maratea et al. 1985) als Ausnahme angesehen. In letzteren Hybridproteinen umfaßt der E-Anteil mindestens die Protein-E Domänen 1 und 2 (Tab.5). Die Expression des E29'-lacZ Gens (Buckley und Hayashi 1986) und des in dieser Arbeit beschriebenen E30'-lacZ Gens wirkte auf E. coli nur letal. Es wird daher angenommen, daß im E29'-cat-Fusionsprotein Protein-E Domäne 2, die für die Protein-E Lyse funktionell notwendig erscheint, durch eine entsprechende Domäne des cat Genprodukts ersetzt werden kann.

Möglicherweise sind intermolekulare Interaktionen zwischen den Protein-E Domänen 2 und/oder 3 für die Oligomerisierung von Protein-E innerhalb der Zellhülle verantwortlich. Obwohl in den Domänen 2 und 3 geladene Aminosäuren vorkommen, weisen sie dennoch eine geringe Oberflächenwahrscheinlichkeit und überwiegend hydrophobe Aminosäuren auf (Tab.5).

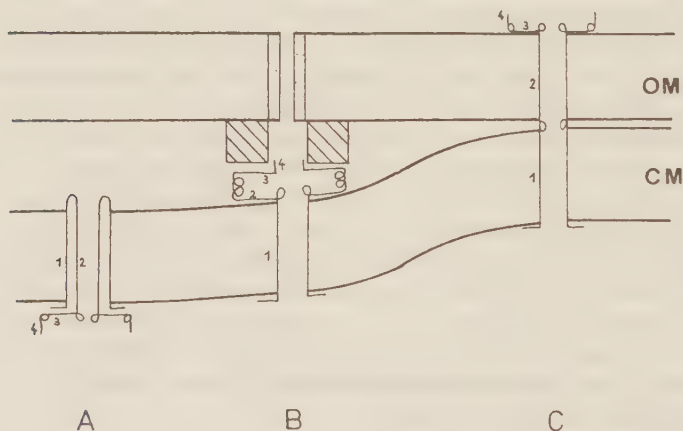
Protein-E Domäne 4 (Tab.5) scheint zur Oligomerisierung nicht notwendig zu sein, da sie ohne größere Beeinträchtigung des Lysepotentials von Protein-E deletiert werden kann (Schüller et al. 1985). Es ist denkbar, daß sie eine Funktion in der Positionierung der vorgeschlagenen Protein-E spezifischen Tunnelstruktur einnimmt.

Zur Klärung der Frage, ob Protein-E Domäne 2 und/oder 3 an der Oligomerisierung beteiligt ist, kann der weitere Austausch kleiner Proteindomänen, deren membranspannende oder Oligomerisierungsfunktion näher untersucht ist, von

funktionsverwandten Proteinen hilfreich sein. Protein-S des Phagen Lambda weist funktionelle Ähnlichkeit mit Protein-E auf und die Funktionen einzelner Proteindomänen sind gut charakterisiert (Raab et al. 1986). Der Austausch von Protein-S Domänen gegen Domänen von Protein-E kann daher zur Verifizierung der beschriebenen Fusionsanalysen und zum weiteren Studium der Membranintegration von Protein-E beitragen. Für die Integration von Protein-E in die Zellhülle, die durch Oligomerisierung zur Porenbildung führen soll, bestehen zur Zeit verschiedene hypothetische Arbeitsmodelle (Abb.50).

Abb.50: Modelle zur Protein-E Integration in die Zellhülle

Die Zahlen bezeichnen die vorgeschlagenen Protein-E Domänen 1-4 (vergl. Tab.5A). Die cytoplasmatische- (CM) und die äussere Membran (OM) sind schematisch dargestellt.



- Protein-E durchspannt nur die Cytoplasmamembran (Abb.50A):

Diese Pore wäre zwar für *E. coli* letal. Sie kann sehr wahrscheinlich durch das konstruierte E30'- β -Gal-Fusionsprotein hervorgerufen werden. Diese Struktur kann aber die gezeigte Freisetzung von β -Galaktosidase nach Gen E Expression in *E. coli* PC2169(pSB51) nur ungenügend erklären. Ebenso sollte Protein-E dann ausschließlich in der Cytoplasmamembran lokalisiert sein. Dies widerspricht dem Nachweis von Protein-E in der äußeren Membran (Bläsi et al. 1983; Altman et al. 1985).

- Protein-E tritt mit Proteinen der äußeren Membran in Kontakt (Abb.50B):

Das Modell setzt die spezifische Erkennung von äußeren Membranproteinen durch Protein-E Domänen voraus. Damit könnte eine transmembrane Tunnelstruktur durch die innere und äußere Membran von *E. coli* gebildet werden und die Lyse durch das osmotische Druckgefälle zwischen Cytoplasma und Außenmedium erfolgen. Die Freisetzung von β -Galaktosidase verlangt in diesem Modell eine größere Flexibilität der äußeren Membran, als bekannt ist. Wegen des geringen Durchmessers der Poren der äußeren Membran wird dieses Modell nicht favorisiert.

- Protein-E durchspannt beide Membranen (Abb.50C):

Das Modell setzt sogenannte Adhäsionsstellen (Bayer 1979) zwischen innerer und äußerer Membran voraus. Durch die Integration von Protein-E in beide Membranen ist auch der Nachweis von Protein-E in beiden Membranen zu erklären. Die in diesem Modell dargestellte Tunnelstruktur der Protein-E Oligomere stimmt mit den physiologischen Daten zur Protein-E Lyse am besten überein (Witte 1985; Witte et al. 1987).

Adhäsionsstellen als Voraussetzung für die Protein-E Lyse würden auch zum Verständnis anderer Befunde dieser Arbeit beitragen. Adhäsionsstellen konnten bisher nur in exponentiell wachsenden Zellen nachgewiesen werden (M. Bayer, pers. Mitteilung). Stationäre Zellen von *E. coli* können durch Protein-E nicht lysiert werden (Abb.28). Möglicherweise ist das Fehlen von Adhäsionsstellen zwischen innerer und äußerer Membran die Ursache für den lyse-negativen Phänotyp dieser Zellen. Darüber hinaus ist die Protein-E Lyse von der Membranfluidität abhängig (Wadle et al. 1986). Stationäre Zellen weisen gegenüber exponentiell wachsenden Zellen unterschiedliche Lipidzusammensetzung in der Zellhülle auf (Merlie und Pizer 1973). Die Lipidzusammensetzung kann die Schichtdicke der Membranen (Storch und Kleinfeld 1985), die Aktivität und die laterale Mobilität von Membranproteinen beeinflussen (Cherry 1979; Carruthers und Melchior 1986). Die postulierte Oligomerisierung von Protein-E innerhalb der Membranen würde eine hohe laterale Mobilität und/oder die Konformationsänderung von Protein-E Molekülen erfordern. In stationären Zellen könnte die

Porenbildung von Protein-E somit durch die geringe laterale Kompressibilität der Membranlipide verhindert werden. Möglicherweise genügt die induzierte Änderung der Lipidzusammensetzung durch einen Wachstumsimpuls (Abb.29) zur Bildung funktioneller Protein-E Oligomere.

Die aufgrund der Fusionsanalysen geforderte Protein-E Oligomerisierung, die auch im favorisierten Modell (Abb.50C) eine notwendige Voraussetzung darstellt, konnte durch Protein-E spezifische Antikörper belegt werden.

Protein-E konnte durch Immunadsorption aus Protein-E haltigen Membranen mit Hilfe der Antipeptidantikörper A3 spezifisch angereichert werden. Die Reaktivität des anti β -Gal-E' Antiserums mit dem immunadsorbierten Membranprotein bestätigte darüber hinaus die Identität des eluierten Proteins mit Protein-E. Die in dieser Arbeit hergestellten Antipeptidantikörper A3 eröffnen damit die Möglichkeit Protein-E immunoaffinitätschromatographisch zu reinigen und funktionelle Protein-E Studien in künstlichen Membranen durchzuführen.

Ebenso wurden mit dem anti- β -Gal-E' Antiserum 2-3 weitere Proteine mit einem höheren Molekulargewicht als Protein-E erkannt. Es ist anzunehmen, daß sich bei den erkannten Proteinbanden um die geforderten Protein-E Oligomere handelt. Dieser Nachweis von Protein-E Oligomeren mit Hilfe der beiden Protein-E spezifischen Antiseren A3 und D (Tab.8) geben den ersten direkten Hinweis für das vorgeschlagene Protein-E Lyse Modell.

Da die Protein-E Oligomere unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Gel) gefunden wurden, ist anzunehmen, daß mit der Oligomerbildung eine Protein-E - Protein-E Wechselwirkung stattfindet, die zu stabilen Strukturen führt. Ueber die Natur dieser möglichen Wechselwirkungen oder Bindungen kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Altmann E, Young K, Garrett J, Altman R, Young, R (1985) Subcellular localization of lethal lysis proteins of bacteriophage Lambda and PhiX174. *J Virol* 53:1008-1011
- Argos P, Hanei M, Garavito M (1978) The Chou-Fasman secondary structure prediction method with an extended data base. *FEBS Lett* 93:19-24
- Atassi MZ (1975) Antigenic structure of myoglobin: The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. *Immunochem* 12:423-438
- Axen R, Drevin H, Carlsson J (1975) Preparation of modified agarose gels containing thiol groups. *Acta Chem Scan* B29:471-474
- Backman K, Ptashne M, Gilbert W (1976) Construction of plasmids carrying the cI gene of bacteriophage Lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4174-4178
- Barrell BG, Air GM, Hutchison III CA (1976) Overlapping genes in bacteriophage PhiX174. *Nature* 264:34-41
- Batteiger B, Newhall WJ, Jones RB (1982) The use of Tween20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Meth* 55:297-307
- Bayer ME (1979) The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection. In: *Bacterial Outer Membranes* (Ed: Inouye M) Wiley, New York pp. 167-202
- Benbow RM, Hutchison III CA, Fabricant JD, Sinsheimer RL (1971) Genetic map of bacteriophage PhiX174. *J Virol* 7:549-558
- Benbow RM, Mayol RF, Picchi JC, Sinsheimer RL (1972) Direction of translation and size of bacteriophage PhiX174 cistrons. *J Virol* 10:99-114
- Berkhout B, Kastelein RA, Duin v. J (1985) Translational interference at overlapping reading frames in procaryotic messenger RNA. *Gene* 37:171-179
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7:1513-1523
- Bläsi U, Geisen R, Lubitz W, Henrich B, Plapp R (1983) Localization of the bacteriophage PhiX174 lysis gene product in the cell envelope of *Escherichia coli*. In: *The Target of Penicillin* (Ed: Hakenbeck R, Höltje JV, Labischinski H) Walter de Gruyter, Berlin u. New York pp. 205-210

- Bonner WM, Laskey, BA (1974) A film method for Tritium labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 46:83-88
- Boyd A, Holland B (1979) Regulation of the synthesis of surface proteins in the cell cycle of *Escherichia coli* B/r. *Cell* 18:287-296
- Braun V, Bosch V (1973) Distribution of murein lipoprotein between the cytoplasmic and outer membrane of *E. coli*. *FEBS Lett* 39:302-306
- Buckley JK, Hayashi M (1986) Lytic activity localized to membrane spanning region of Φ X174 E protein. *MGG* 204:120-125
- Burnette WN (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified Nitrocellulose and radiographic detection with antibody and iodinated Protein A. *Analyt Biochem* 112:195-203
- Carlsson J, Drevin H, Axen R (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate, a new heterobifunctional agent. *J Biochem* 173:723-737
- Carruthers A, Melchior DL (1986) How bilayer lipids affect membrane protein activity. *TIBS* 11:331-335
- Casadaban MJ, Cohen SN, (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 138:179-207
- Casadaban MJ, Chou J, Cohen NS (1980) In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J Bacteriol* 143:971-980
- Chen CY, Hutchison III CA, Edgell MH (1973) Isolation and genetic localization of three Φ X174 promoter regions. *Nature New Biol* 243:233-236
- Cherry RJ (1979) Rotational and lateral diffusion of membrane proteins. *Biophys Acta* 559:289-327
- Chou PJ, Fasman GD (1974a) Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheets and random coil regions. *Biochemistry* 13:211-222
- Chou PJ, Fasman GD (1974b) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13:222-245
- Clements JB, Sinsheimer RL (1975) RNA metabolism in Φ X174 infected cells. *J Virol* 15:151-160

- Clewell DB (1972) Nature of ColE1 plasmid replication in *E. coli* in the presence of chloramphenicol. *J Bacteriol* 110:667-676
- Cohen GH, Dietzschold B, Ponce de Leon M, Long D, Golub E, Varrichio A, Pereira L, Eisenberg RJ (1984) Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. *J Virol* 49:102-108
- Davies RW (1980) DNA sequence of the int-xis p1 region of the bacteriophage Lambda: overlap of the int and xis genes. *Nucl Acids Res* 12:4757-4768
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6:23-28
- Denhardt DT, Sinsheimer RL (1965) The process of infection with bacteriophage PhiX174. III. Phage maturation and lysis after synchronized infection. *J Mol Biol* 12:641-646
- Dickson RC, Abelson J, Barnes WM, Reznikoff WS (1975) Genetic regulation: The lac control region. *Science* 187:27-35
- Dunn JJ, Buzask-Pollert E, Studier FW (1978) Mutations of bacteriophage T7 that effect initiation of synthesis of the gene O3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:2741-2745
- Edlund TD, Ihler GM (1980) Long range base pairing in bacteriophage PhiX174 single stranded DNA. *J Mol Biol* 142:131-144
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Bogner J (1985) Induction of Hepatitis A virus neutralizing antibody by a virus specific synthetic peptide. *J Virol* 55:836-839
- Farabaugh PJ (1978) Sequence of the lac i gene. *Nature* 274:765-769
- Fasman GD (1976) *Proteins: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (Ed: Fasman GD) Vol1 3rd edn. p8 Cleveland: CRC Press
- Fowler AV, Zabin J (1983) Purification, structure and properties of hybrid β -galactosidase proteins. *J Biol Chem* 258:14354-14358
- Freifelder DE, Kleinschmidt AK, Sinsheimer RL (1964) Electron microscopy of single stranded DNA: Circularity of DNA of bacteriophage PhiX174. *Science* 146:254-255
- Gillam S, Astell CR, Jahnke P, Hutchison III CA, Smith M (1984) Construction and properties of a ribosome binding mutation in gene E of PhiX174 bacteriophage. *J Virol* 52:892-896
- Gillam S, Atkinson T, Markham A, Smith M (1985) Gene K of bacteriophage PhiX174 codes for a protein which affects the burst size of phage production. *J Virol* 53:708-709

Godson GN, Fiddes JC, Barrell BG, Sanger F (1978) Comparative DNA-Sequence analysis of the G4 and PhiX174 genom. In: The single stranded DNA phages. (Ed: Denhardt DT, Dressler D, Ray DS Cold Spring Harbor Laboratory, New York pp.51-86

Goodfriend TL, Levine L, Fasman GD (1964) Antibody to Bradykinin and Angiotensin: A use of Carbodiimides in immunology. Science 144:1344-1346

Granier J, Osguthorpe DJ, Robson B (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for prediction secondary structure of globular proteins. J Mol Biol 120:97-120

Halegoua S, Schizawa J, Inouye M (1977) A new form of structural lipoprotein of the outer membrane of Escherichia coli. J Biochem 252:2324-2330

Halfmann G, Leduc M, Lubitz W (1984) Different sensitivity of autolytic deficient Escherichia coli mutants to the mode of induction. FEMS Microbiol Lett 24:205-208

Halfmann G, Lubitz W (1986) Differential induction of Escherichia coli autolysis by Penicillin and the bacteriophage PhiX174 gene E product. J Bacteriol 166:683-685

Halfmann G (1983) Untersuchungen zum Mechanismus der Lyse von Escherichia coli durch den Bakteriophagen PhiX174. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Hamatake RK, Aoyama A, Hayashi M (1985) The J gene of bacteriophage PhiX174: In vitro analysis of J protein function. J Virol 54:345-350

Hayashi M, Fujimura FK, Hayashi MN (1976) Mapping of bacteriophage PhiX174 in vivo messenger RNA's. Proc Natl Acad Sci USA 73:3519-3523

Hayashi MN, Hayashi M, Imai M (1981a) Bacteriophage PhiX174 specific m-RNA synthesis in cells deficient in termination factor rho activity. J Virol 38:198-207

Hayashi MN, Hayashi M (1981b) Stability of bacteriophage PhiX174 m-RNA in vivo. J Virol 37:506-510

Hayashi MN, Hayashi M (1985) Cloned DNA sequences that determine m-RNA stability of bacteriophage PhiX174 in vivo are functional. Nucl Acids Res 13:5937-5948

Harkness RE, Ishiguro EE (1983) Temperature sensitive autolysis defective mutants of Escherichia coli. J Bacteriol 155:15-21

Heijne G (1981) Membrane Proteins. Eur J Biochem 120:275-278

Henrich B, Lubitz W, Plapp R (1982a) Lysis of Escherichia coli by induction of cloned PhiX174 genes. MGG 185:493-497

Henrich B, Lubitz W, Fuchs E (1982b) Use of benzoylated-naphtoylated DEAE Cellulose to purify and concentrate DNA eluted from agarose gels. *J Biochem Biophys Meth* 6:149-157

Henrich B, Plapp R (1984) Use of a cloned bacteriophage gene to disrupt bacteria. *J Biochem Biophys Meth* 10:25-34

Henrich B (1983a) Klonierung und Expression des Lysegens des Bakteriophagen PhiX174 in *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Kaiserslautern

Henrich B, Lubitz W, Plapp R (1983b) Expression of PhiX174 lysis gene cloned into different plasmids. In: *The Target of Penicillin*. (Ed: Hakenbeck R, Höltje JV, Labischinski H) de Gruyter Berlin und New York pp.197-203

Hoess RH, Foeller C, Bidwell K, Landy A (1980) Site specific recombination functions of bacteriophage Lambda: DNA sequence of regulatory regions and overlapping structural genes for Int and Xis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2482-2486

Hopp TP, Woods KR (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3824-3828

Hsu S, Fanger H (1981) Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem* 29:577-580

Hutchison III CA, Sinsheimer RL (1966) The process of infection with bacteriophage PhiX174. Mutations in a PhiX lysis gene. *J Mol Biol* 18:429-447

Inouye S, Wang S, Sekizawa J, Halegoua S, Inouye M (1977) Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1004-1008

Kalb JR, Bernlohr VF, Bernlohr R (1977) A new spectrometric assay for protein in cell extracts. *Analyt Biochem* 82:362-371

Kalmins A, Otto K, Rüther U, Müller-Hill B (1983) Sequence of the lac Z gene of *Escherichia coli*. *EMBO J* 2:593-597

Karplus PA, Schulz GE (1985) Prediction of chain flexibility in proteins. A tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften* 72:212-213

Katz DH (1980) Adaptive differentiation of lymphocytes: Theoretical implications for cell-cell recognition and regulation of immune response. *Adv Immunol* 29:137-207

Kornberg A (1980) *DNA Replication*. WH Freeman and Company, San Francisco

- Kornberg A (1982) Supplement to DNA Replication. WH Freeman and Company, San Francisco
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lau PCK, Spencer JH (1985) Nucleotide sequence and genom organization of bacteriophage S13 DNA. *Gene* 40:273-284
- Lang BF, Burger G (1986) A collection of programs for nucleic acid and protein analysis, written in Fortran 77 for IBM-PC compatible microcomputers. *Nucl Acids Res* 14:455-465
- Lee N, Inouye M (1974) Outer membrane proteins of *Escherichia coli*: Biosynthesis and assembly. *FEBS Lett* 39:167-170
- Leduc M, Kasra R, Singer J, Heijenoort v. J (1984) EDTA induced autolysis in *Escherichia coli* and isolation of resistance mutants. *FEMS Microbiol Lett* 23:137-142
- Leduc M, Heijenoort v. J (1980) Autolysis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 142:52-59
- Lubitz W, Plapp R (1980) Murein degradation in *Escherichia coli* infected with bacteriophage PhiX174. *Curr Microbiol* 4:301-304
- Lubitz W, Halfmann G, Plapp R (1984a) Lysis of *Escherichia coli* after infection with PhiX174 depends on the regulation of the cellular autolytic system. *J Gen Microbiol* 130:1079-1087
- Lubitz W, Harkness RE, Ishiguro EE (1984b) Requirement for a functional host cell autolytic system for lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage PhiX174. *J Bacteriol* 159:385-387
- Lubitz W, Pugsley AP (1985) Changes in host cell phospholipid composition of PhiX174 gene E product. *FEMS Microb Lett* 30:171-175
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Mansfeld v. ADM, Teefelen v. HAAM, Zandby J, Baas PD, Jansz HS, Veeneman GH, Boom v. JH (1982) A* protein of bacteriophage PhiX174 carries an oligonucleotide which it can transfer to the 3'OH of a DNA chain. *FEBS Lett* 150:103-108
- Maratea D, Young K, Young R (1985) Deletion and fusion analysis of the phage PhiX174 lysis gene E. *Gene* 40:39-46
- Markert A, Zillig W (1965) Studies on lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage PhiX174. *Virology* 25:88-97

- Maxam AM, Gilbert W (1980) Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Meth in Enzymol* 68:326-331
- Mellado RP, Salas M (1982) High level synthesis in *Escherichia coli* of the *Bacillus subtilis* phage Φ 129 proteins P3 and P4 under the control of phage Lambda pL promotor. *Nucl Acids Res* 10:5773-5784
- Merlie JP, Pizer LJ (1973) Regulation of phospholipid synthesis in *Escherichia coli* by Guanosin Tetraphosphate. *J Bacteriol* 116:355-366
- Merill CR, Goldman D, Ebert ML, Sedman SA (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211:1437-1438
- Michaelis S, Beckwith J (1982) Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Ann Rev Microbiol* 36:435-465
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Moore S, Stein WH (1954) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J Biol Chem* 211:907-913
- Morrison DA (1977) Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol* 132:349-351
- Müller-Esterl W, Vogel R (1985) Workshop: Western Blotting und Immunoprinting. Medizinische Klinik1, München, Oktober 1985
- Müller UR, Fitch WM (1982) Evolutionary selection for perfect hairpin structures in viral DNA's. *Nature* 298:582-585
- Nakane PK, Kawaoi A (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 22:1084-1091
- Oka A, Sugisaki H, Takanami M (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin transposon Tn903. *J Mol Biol* 147:217-226
- Olins PO, Erickson BD, Burgess R (1983) Overproduction of *E. coli* NusA protein. *Gene* 26:11-18
- Peden KWC (1983) Revised sequence of the Tetracyclin resistance gene of pBR322. *Gene* 22:277-280
- Pollock TJ, Tessman ES, Tessman J (1978) Identification of lysis protein E of bacteriophage Φ X174. *J Virol* 28:408.410
- Raab R, Neal G, Garret J, Grimaila R, Fusselman R, Young R (1986) Mutational analysis of bacteriophage Lambda lysis gene S. *J Bacteriol* 167:1035-1042

Randall LL (1983) Translocation of domains of nascent periplasmic proteins across the cytoplasmic membrane is independent of elongation. *Science* 33:231-240

Reichlin M (1980) Use of Glutaraldehyd as a coupling agent for proteins and peptides. *Meth Enzymol* 70:159-165

Reeve J (1979) Use of minicells for bacteriophage directed polypeptide synthesis. *Meth Enzymol* 68:493-511

Reeve J (1981) PhiX174 directed DNA and protein synthesis in infected minicells. *J Virol* 40:396-402

Remaut E, Stanssens P, Fiers W (1981) Plasmid vectors for high efficiency expression controlled by the pL promotor of Coliphage Lambda. *Gene* 15:81-93

Remaut E, Tsao H, Fiers W (1983) Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature regulated run-away replication. *Gene* 22:103-113

Revet B, Zarling DA, Jovin TM, Delain E (1984) Different Z-DNA forming sequences are revealed in PhiX174 RFI by high resolution dakfield immuno-electron microscopy. *EMBO J* 3:3353-3358

Rich A, Nordheim A, Wang AHJ, (1984) The chemistry and biology of left handed Z-DNA. *Ann Rev Biochem* 53:791-846

Ron EZ, Davis BD, Kohler RE (1966) Polysomes extracted from *Escherichia coli* by freeze-thaw lysozyme lysis. *Science* 153:1119-1120

Rüther U, Koenen M, Otto K, Müller-Hill B (1981) pUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA. *Nucl Acids Res* 9:4087-4098

Rüther U (1982) pUR250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucl Acids Res* 10:5765-5772

Rüther U, Müller-Hill B (1983) Easy identification of cDNA clones. *EMBO J* 2:1791-1794

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, Hutchison III CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage PhiX174 DNA. *Nature* 265:687-859

Sanger F, Coulson AR, Friedman T, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Fiddes JC, Hutchison III CA, Slocombe PM, Smith M (1978) The nucleotide sequence of bacteriophage PhiX174. *J Mol Biol* 125:225-246

Schottel LJ, Smisky JJ, Cohen SN (1984) Effects of alterations in the translational control region on bacterial gene expression: use of cat gene constructs transcribed from the lac promotor as a model system. *Gene* 28:177-193

- Schüller A, Harkness RE, Rüther U, Lubitz W (1985) Deletion of C-terminal amino acid codons of PhiX174 gene E: Effect on its lysis inducing properties. Nucl Acids Res 213:4243-4153
- Schümperli D, Kennedy Mc K, Sobieski DA, Rosenberg M (1982) Translational coupling at an intercistronic boundary of the *Escherichia coli* galactose operon. Cell 30:865-871
- Seckler R, Wright K, Overath P (1983) Peptide specific antibody locates the COOH terminus of the lactose carrier of *E. coli* on the cytoplasmic side of the plasma membrane. J Biol Chem 258:10817-10820
- Shaw DC, Walker JE, Northrop FD, Barrell BG, Godson GN, Fiddes JC (1978) Gene K, a new overlapping gene in bacteriophage G4. Nature 272:510-515
- Shaw WV (1971) Comparative enzymology of chloramphenicol resistance. Ann NY Acad Sci 182:234-242
- Sheratt D (1977) The transposon Tn1 as a probe for studying ColE1 structure and function. MGG 151:151-160
- Shimmin LC, Vanderwell D, Harkness RE, Curie AR, Galloway A, Ishiguro EE (1984) Temperature sensitive β -Lactam tolerant mutants of *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 130:1315-1323
- Shine J, Dalgarno L (1974) The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16s ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc Natl Acad Sci USA 75:2741-2745
- Shinnick TM, Sutcliffe JG, Green N, Lerner RA (1983) Synthetic peptides immunogens as vaccines. Ann Rev Microbiol 37:425-446
- Sinsheimer RL (1959) Purification and properties of bacteriophage PhiX174. J Mol Biol 1:37-42
- Sinsheimer RL (1968) Bacteriophage PhiX174 and related viruses. Progr Nucl Acid Res Mol Biol 8:115-169
- Stanssens P, Remaut E, Fiers W (1985) Alterations upstream from the Shine Dalgarno region and their effect on bacterial gene expression. Gene 36:211-223
- Steers JR, Cuatrecasas P, Pollard HB (1971) The purification of β -galactosidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography. J Biol Chem 246:196-200
- Storch J, Kleinfeld AM (1985) The lipid structure of biological membranes. TIBS 10:418-421
- Studier W (1973) Analysis of bacteriophage T7 early RNA's and protein on slab gels. J Mol Biol 79:237-248

- Sutcliffe JG (1979) Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol XXXXIII:77-90
- Sutcliffe JG, Shinnick TM, Green N, Lerner RA (1982) Antibody that react with predetermined sites on proteins. Science 219:660-666
- Sutcliffe JG, Milner RJ, Shinnick TM, Bloom FE (1983) Identifying the protein products of brain specific genes with antibodies to chemically synthesized peptides. Cell 33:671-682
- Tainer JA, Getzoff ED, Alexander H, Houghten RA, Olson AJ, Lerner RA, Hendrickson WA (1984) The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. Nature 312:127-133
- Tessman ES (1966) Mutants of bacteriophage S13 blocked in infectious DNA synthesis. J Mol Biol 17:218-236
- Tessman ES, Tessman J (1978) The genes of the isometric phages. In: The single stranded DNA phages. (Ed: Denhardt DT, Dressler D, Ray DS) Cold spring Harbor Laboratory, New York pp.9-29
- Tessman ES, Tessman J, Pollock TJ (1980) Gene K of bacteriophage PhiX174 codes for a nonessential protein. J Virol 33:557-560
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354
- Ullmann A (1984) One step purification of hybrid proteins which have B-galactosidase activity. Gene 29:27-31
- Wadle D, Henrich B, Plapp R (1986) Effects of mutations in genes fadR, fadB, fadE and envC of Escherichia coli on the action of the lysis gene of bacteriophage PhiX174. Curr Microbiol 14:65-69
- Walter G, Hutchison MA, Hunter T, Eckhard W (1982) Purification of polyoma virus medium size tumor antigen by immunoaffinity column. Proc Natl Acad Sci USA 79:4025-4029
- Wickner WT, Lodish HF (1985) Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. Science 230:400-407
- Witte A (1985) Physiologische Untersuchungen zur Infektion und Lyse von Escherichia coli durch den Bakteriophagen PhiX174. Diplomarbeit, Universität, Kaiserslautern
- Witte A, Lubitz W, Bakker EP (1987) Proton-motive-force-dependent step in the pathway to lysis of Escherichia coli induced by bacteriophage PhiX174 gene E product. J Bacteriol 169:in press

Wright KJ, Overath P (1984) Purification of the lactose H⁺ carrier of *Escherichia coli* and characterization of galactoside binding and transport. *Eur J Biochem* 138:497-508

Young KD, Young R (1982) Lytic action of cloned *PhiX174* genes. *J Virol* 44:993-1002

Zipser D (1963) A study of the urea produced subunit of β -galactosidase. *J Mol Biol* 7:113-121

Zoller M, Matzku S (1976) Antigen and antibody purification by immunoadsorption: Elimination of non-biospecifically bound proteins. *J Immunol Meth* 11:287-295

ANHANG

1
Met Ser Asn Ile Gln Thr Gly Ala Glu Arg Met Pro His Asp Leu Ser His Leu Gly Phe
ATG TCT AAT ATT CAA ACT GGC GCC GAG CGT ATG CCG CAT GAC CTT TCC CAT CTT GGC TTC
61
Leu Ala Gly Gln Ile Gly Arg Leu Ile Thr Ile Ser Thr Thr Pro Val Ile Ala Gly Asp
CTT GCT GGT CAG ATT GGT CGT CTT ATT ACC ATT TCA ACT ACT CCG GTT ATC GCT GGC GAC
121
Ser Phe Glu Met Asp Ala Val Gly Ala Leu Arg Leu Ser Pro Leu Arg Arg Gly Leu Ala
ICC TTC GAG ATG GAC GCC GAT GGC GCT CTC CGT CTT TCT CCA TTG CGT CGT GGC CTT GCT
181
Ile Asp Ser Thr Val Asp Ile Phe Thr Phe Tyr Val Pro His Arg His Val Tyr Gly Glu
ATT GAC TCT ACT GTA GAC ATT TTT ACT TTT TAT GTC CCT CAT CGT CAC GTT TAT GGT Gaa
241
Gln Trp Ile Lys Phe Met Lys Asp Gly Val Asn Ala Thr Pro Leu Pro Thr Val Asn Thr
CAG TGG ATT AAG TTC ATG AAG GAT GGT GTT AAT GCC ACT CCT CTC CCG ACT GTT AAC ACT
301
Thr Gly Tyr Ile Asp His Ala Ala Phe Leu Gly Thr Ile Asn Pro Asp Thr Asn Lys Ile
ACT GGT TAT ATT GAC CAT GCC GCT TTT CTT GGC ACG ATT AAC CCT GAT ACC AAT AAA ATC
361
Pro Lys His Leu Phe Gln Gly Tyr Leu Asn Ile Tyr Asn Asn Tyr Phe Lys Ala Pro Trp
CCT AAG CAT TTG TTT CAG GGT TAT TTG AAT ATC TAT AAC AAC TAT TTT AAA GCG CCG TGG
421
Met Pro Asp Arg Thr Glu Ala Asn Pro Asn Glu Asn Ser Gly Ser Gly Glu Ala Trp Pro
ATG CCT GAC CBT ACC GAG GCT AAC CCT AAT GAG AAT TCC GGA TCC GGC GAA GCT TGG CCA
481
Ser Leu Ala Gly Ser Ser Thr Pro Asp Ala Ser Trp Pro Ala Ser Pro Ala Pro Gln Val
AGC TTG GCC GGA TCC TCT ACG CCG GAC GCA TCG TGG CCG GCA TCA CCG GCG CCA CAG GIG
541
Arg Leu Leu Ala Pro Ile Ser Pro Thr Ser Pro Met Gly Lys Ile Gly Leu Ala Thr Ser
CGG TTG CTG GCG CCT ATA TCG CCG ACA TCA CCG ATG GGG AAG ATC GGG CTC GCG ACT TCG
601
Gly Ser 555
GGC TCA TGA

pSB12 LINKER

1. Nukleotidsequenz des F'-Fusionsgens und Aminosäuresequenz des F'-Fusionsproteins von Plasmid pSB12 und Plasmid pSB22

--- Anteil des F-Gens von PhiX174

... Anteil der Tet Gen Region von Plasmid pLc236

2. Lambda pL spezifische m-RNA von Plasmid pSB12

A: Nukleotidsequenz des Transkriptes

Die Gen E spezifische Ribosomenbindungsstelle (E) und das Startcodon sind hervorgehoben.

B: Mögliche intramolekulare Basenpaarungen auf dem Transkript

ENERGIES LARGER-15.0 kcal

Ⓐ

AUCAGCAGGA	CGCACGAGC	ACCAUGAAGG	UGACGCUU	AAAAUUAAG	CCUGAAGAAG
10	20	30	40	50	60
GSCAGCAUUC	AAAGCAGAAG	GCUUUGGGUG	GUGUGAUACG	AAACGAAAGC	UUGGAUUUCU
70	80	90	100	110	120
CAUUCAGGCU	UCUGCCGUUU	UGGAUUUAAC	CGAAGAUAGU	UUCGAUUUCU	UGACGAGUAA
130	140	150	160	170	180
CAAGAUUUGG	UAUUGCUACG	ACCGCUCUCG	UGCUCGUCGC	UGCGUUGAGG	CUUGCGUULG
190	200	210	220	230	240
UGAUUAGCGU	GACUUUGUGG	GAUACCCUCG	CUUUCGUCU	CCUGUUGAGU	UUAUUGCUCG
250	260	270	280	290	300
CGUCAUUGCU	UAUUUAUGUC	AUCCGUCUAA	CAUUCAAACG	GCCGUCUCA	UCAUGGAAGG
310	320	330	340	350	360
CGCUGAAUUU	ACGGAAAACA	UAUUUAUUGG	CGUCGAGCGU	CCGGUUAAGG	CGGCUGAAUU
370	380	390	400	410	420
GUUCGCGUUC	ACCUUGCGUC	UACGCGCAGG	AAACACUGAC	GUUCUACUG	ACGCAGAAGA
430	440	450	460	470	480
AAACGUGCGU	CAAAAAUUC	GUGCGGAAGG	AGUGAUGAAG	UGUCUAAAGC	UAAAAACGU
490	500	510	520	530	540
UCUGGCGCUC	GCCCUGGUCG	UCCGCGAGCG	UUGCGAGGUA	CUAAAGGCAA	GCGUAAAGGC
550	560	570	580	590	600
GCUCGUCUUU	GGUAUUGAGG	UGGCUAACAA	UUUUAAUUGC	AGGGGCUUCG	GCCCCUUACU
610	620	630	640	650	660

E

UGA

B

[illegible]

3. PhiX174 m-RNA Spezies XIII

A: Nukleotidsequenz der m-RNA XIII

Die Ribosomenbindungsstellen der PhiX174 Gene D (D) und E (E) sowie die zugehörigen Startcodons sind hervorgehoben.

B: Mögliche intramolekulare Basenpaarungen auf dem Transkript F ENERGIES LARGER-15.0 kcal
Der PhiX174 Terminator-J ist eingerahmt.

(A)

D	GAU <u>SCGU</u> UUC	AACCA <u>CUA</u> AU	<u>AGG</u> UAAGAA	UCA <u>UGA</u> GUCA	AGUUA <u>CUG</u> AA	CAAUCC <u>GU</u> AC
	10	20	30	40	50	60
	GUUCCAGAC	CGCUUUGGC	UCUUAUAGC	UCAUUCAGG	UUCUGCCGUU	UUGGAUUAA
	70	80	90	100	110	120
	CCGAAGAUA	UUUCGAUUU	CUGACGAGUA	ACAAAGUUG	GAUUGCUACU	GACCGUCUC
	130	140	150	160	170	180
E	GUGCUCGUC	GUGCGUAGC	GCUUGCGUU	AUGGUA <u>CGC</u> U	GGACUUUGUG	GGAUACCCUC
	190	200	210	220	230	240
	GCUUUCGUC	UCCUGUAG	UUUAUUGCG	CCGUCAUUG	UUUAUUGU	CAUCCCGUA
	250	260	270	280	290	300
	ACAUUCAAC	GGCCUGUC	AUCAUGGAG	CGCGUAAU	UACGGAAAC	AUUUAUAAU
	310	320	330	340	350	360
	GCUGCGAGC	UCCGGUAAA	CGCGCUGAA	UGUUCGCGU	UACCUUGCG	GUACGCGAG
	370	380	390	400	410	420
	GAACACUGA	CGUUCUACU	GACGCAGAAG	AAAACGUGC	UCAAAAAUA	CGUGCGGAG
	430	440	450	460	470	480
	GAGUGAUGA	AUGUCUAAAG	GUAAAAACG	UUCUGGCGC	CGCCUGGUG	GUCCGAGCC
	490	500	510	520	530	540
	GUUGCGAGG	ACUAAAGCA	AGCGUAAAG	CGCUCGUCU	UGGUAUGAG	GUGGUCAAC
	550	560	570	580	590	600
	AUUUUAAUG	CAGGGGCUU	GGCCCCUAC	UUGA		
	610	620	630			

(B)

STACKING ENERGY = -15.0	STACKING ENERGY = -13.7	STACKING ENERGY = -16.0	STACKING ENERGY = -20.0	STACKING ENERGY = -16.7
1 GAU <u>SCGU</u> UUC	100 CUUCU <u>BC</u>	170 U <u>BAC</u> CGUC	345 C <u>BAC</u> CGUC	612 <u>AGG</u> UAAGAA
365 CUBCG <u>UA</u> A	460 A <u>AA</u> BCG	593 A CUBCG <u>U</u> G	576 G CUCGCG <u>U</u>	627 U CCGCG <u>U</u>
STACKING ENERGY = -15.3	STACKING ENERGY = -17.1	STACKING ENERGY = -16.7	STACKING ENERGY = -20.0	
D 17 UA <u>AGG</u> UAAGAA	100 CUUCU <u>BC</u>	190 GCU <u>BC</u> CG	345 C <u>BAC</u> CGUC	
364 AUUAUUC <u>GU</u> U	460 A <u>AA</u> BCG	537 C <u>BAC</u> CG	576 G CUCGCG <u>U</u>	
STACKING ENERGY = -16.2	STACKING ENERGY = -17.1	STACKING ENERGY = -16.0	STACKING ENERGY = -15.7	
17 GA <u>AA</u> UCU	105 GCGCGU <u>U</u>	191 CUGCGU <u>G</u>	346 B <u>AG</u> CGUC	
124 CUUA <u>GU</u> A	313 CGCGA <u>AA</u>	447 G <u>AC</u> CGA <u>U</u>	435 CUUCG <u>CA</u>	
STACKING ENERGY = -20.4	STACKING ENERGY = -16.0	STACKING ENERGY = -15.2	STACKING ENERGY = -16.7	
54 UCGUA <u>CG</u> U	105 GCGCGU <u>U</u>	195 GUU <u>U</u> CGU	340 A <u>B</u> CGCGU	
478 AGCGU <u>CA</u>	365 CGCGA <u>AA</u> U	423 CGCGU <u>CG</u>	543 U <u>U</u> CGCGA	
STACKING ENERGY = -19.1	STACKING ENERGY = -17.3	STACKING ENERGY = -15.4	STACKING ENERGY = -15.7	
56 CGUA <u>CC</u> UU	114 UUA <u>AC</u> CG	201 GCU <u>BC</u>	343 GCGU <u>GA</u>	
440 CGUG <u>CA</u> A	300 AA <u>U</u> CGC	543 CGA <u>AC</u> G	424 CCGCGU	
STACKING ENERGY = -16.0	STACKING ENERGY = -21.1	STACKING ENERGY = -16.7	STACKING ENERGY = -16.2	
48 GACCGCU <u>U</u>	120 ACCGA <u>BA</u> U	237 CU <u>CC</u> CG	399 UUA <u>CC</u> UU	
576 CUGG <u>UG</u> A	54 UGC <u>U</u> CGU	549 GCGA <u>CG</u>	505 AA <u>AG</u> GA	
STACKING ENERGY = -23.7	STACKING ENERGY = -15.4	STACKING ENERGY = -18.7	STACKING ENERGY = -17.7	
70 CGCGU <u>UG</u> CG	121 CCGA <u>AG</u>	240 CGCU <u>UC</u> CG	401 A <u>CC</u> CGU	
344 GCGA <u>AA</u> U	422 GCGU <u>C</u>	333 CGCGA <u>AG</u>	402 A <u>CC</u> CGU	
STACKING ENERGY = -15.4	STACKING ENERGY = -17.7	STACKING ENERGY = -18.6	STACKING ENERGY = -17.1	
97 AUUCAGGCU <u>U</u>	142 UG <u>CA</u> CGUA	243 UUC <u>CG</u> CG	440 UCA <u>CC</u> CA	
143 UAGGUUGA <u>U</u>	190 GCGUG <u>CG</u> U	424 AA <u>AG</u> GA	443 A <u>CC</u> CGU	
STACKING ENERGY = -16.0	STACKING ENERGY = -15.7	STACKING ENERGY = -17.3	STACKING ENERGY = -13.4	
74 CAGGCU <u>U</u> C	143 BACG <u>UA</u>	249 SCUG <u>CG</u> U	473 UCGG <u>GA</u>	
309 GUCG <u>UG</u>	576 CUGG <u>UG</u>	417 CG <u>UG</u> GA	537 ACGG <u>U</u>	
STACKING ENERGY = -19.2	STACKING ENERGY = -18.4	STACKING ENERGY = -15.4	STACKING ENERGY = -18.4	
97 AGCGU <u>UC</u> CG	151 CA <u>AA</u> GUUG	712 ACGG <u>U</u> C	547 GUA <u>CC</u> AA	
419 UCGCGGAG <u>C</u>	229 GUU <u>U</u> CGG	543 UG <u>CG</u> CG	566 UA <u>AG</u> GUUG	

Met Ser Asn Ile Gln Thr Gly Ala Glu Arg Met Pro His Asp Leu Ser His Leu Gly Phe
ATG TCT AAT ATT CAG ACT GGC GCC GAG CGT ATG CCG CAT GAC CTT TCC CAT GCT GGC TTC
 61
Leu Ala Gly Gln Ile Gly Arg Leu Ile Thr Ile Ser Thr Thr Pro Val Ile Ala Gly Asp
CTT GCT GGT CAG ATT GGT CGT CTT ATT ACC ATT TCA AGT AGT CCG GGT ATC GCT GGC GAC
 121
Ser Phe Glu Met Asp Ala Val Gly Ala Leu Arg Leu Ser Pro Leu Arg Arg Gly Leu Ala
TCC TTC GAG ATG GAC GCC GTT GGC GCT CTC CGT CTT TCT CCA TIG CCG CGT GGC GCT GCT
 181
Ile Asp Ser Thr Val Asp Ile Phe Thr Phe Tyr Val Pro His Arg His Val Tyr Gly Glu
ATT GAC TCT ACT GTA GAC ATT TTT ACT TTT TAT GTC CCG CAT CGT CAC GTT TAT GGT GAG
 241
Gln Trp Ile Lys Phe Met Lys Asp Gly Val Asn Ala Thr Pro Leu Pro Thr Val Asn Ser
CAG TGG ATT AAG TTC ATG AAG GAT GGT GTT AAT GCC ACT CCT CAC CCG ACT GTC AAT TCC
 301
Gly Ser Gly Gln Ala Trp Pro Ser Leu Ala Gly Ser Ser Thr Pro Asp Ile Ser Trp Pro
GGA TCC GGC GAT GCT TGG CCA AGC TTG GCC GGA TCC TCT ACG CCG GAC GCA TCG TGG CCG
 361
Ala Ser Pro Ala Pro Gln Val Arg Leu Leu Ala Pro Ile Ser Pro Thr Ser Pro Met Glu
GCA TCA CCG GCG CCA CAG GTG CGC TTG CTG GCG CCT Ala TCG CCG AGC TCA GCG ATG GGG
 421
Lys Ile Gly Leu Ala Thr Ser Gly Ser 555
AAG ATC GGG CTC GCC ACT TCG GGC TCA TGA

4. Nukleotidsequenz des F' Hybridgens und Aminosäuresequenz des F' Hybridproteins von Plasmid pSB35

--- Anteil des PhiX174 F-Gens

— Anteil der tet Gen Region von Plasmid pLc236

Das Molekulargewicht beträgt 15,7 kd.

Met Arg Lys Phe Asp Leu Ser Leu Arg Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Phe Ala Thr Phe Arg
 ATG AGA AAA TTC GAC TTA TCC TTG CCG AGC TCG AGA AGC TCT TAC TTT GCG ALC TTT CCG
 51
 His Gln Leu Thr Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ala Leu Asp Glu Glu Lys Trp Leu Asn Met
 CAT CAA CTA ACG ATT CTG TCA AAA ACT GAC GCG TTG GAT GAG GAG AAG TGS CTT AAT ATG
 121
 Leu Gly Thr Phe Val Lys Asp Trp Phe Arg Tyr Glu Ser His Phe Val His Gly Arg Asp
 CTT GGC ACC TTC GTC AAG GAC TGS TTT AGA TAT GAG TCA CAT TTT GTT CAT GGT NSA GAT
 181
 Ser Leu Val Asp Ile Leu Lys Glu Arg Gly Leu Leu Ser Glu Ser Asp Ala Val Gln Pro
 TCT CTT GTT GAC ATT TTA AAA GAG CGT GGA TTA CTA TCT GAG TCC GAT GCT GGT CAA CCG
 241
 Gly Ile Arg Arg Pro Ala Ala Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu
 GGG ATC CGT CGA CCT GCA GCA ATG GCA ACA ACG TTG CCG AAA CTA TTA ACT GGC GAA CTA
 301 **LINKER pSB150**
 Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly
 CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA TTA ATA GAC TGG ATG GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA
 361
 Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly
 CCA CTT CTG CCG TCG GCC CTT CCG GCT GGC TGG TTT ATT GCT GAT AAG TCT GGA GCC GGT
 421
 Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg Ile
 GAG CGT GGG TCT CCG GGT ATC ATT GCA GCA CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT ATC
 481
 Val Val Ile Val Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn Arg Gln Ile Ala
 GTA GTT ATC TAC ACG ACG GGG AGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT AGA CAG ATC GCT
 541
 Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp ###
 GAG ATA GCT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG TAA

5. Nukleotidsequenz des C'-Amp'Hybridgens und Aminosäuresequenz des C'-Amp' Hybridproteins von Plasmid pSB150

--- Anteil des PhiX174 C-Gens

— Anteil des Amp Gens von Plasmid pLa2311

Das Molekulargewicht beträgt 21,2 kd.



LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Udo Bläsi
Geburtsdatum: 17. 06. 1957
Geburtsort: Altenkirchen
Nationalität: Deutscher
Familienstand: verheiratet seit 2.9.1983

Werdegang:

1964 - 1968 Grundschule Altenkirchen
1968 - 1977 Staatliches Gymnasium Kusel
Reifeprüfung, Juni 1977
1977 - 1978 Grundwehrdienst
1978 - 1983 Studium der Biologie an der Universität
Kaiserslautern;
Diplomprüfungen in den Fächern
Mikrobiologie, Biotechnologie,
Pflanzenphysiologie, Organ. Chemie;
Diplomarbeit bei PD Dr. Werner Lubitz
über "PhiX174 abhängige Veränderungen
der Cytoplasmamembran von E. coli" im
Fachbereich Biologie, Abt. Mikrobiologie,
der Universität Kaiserslautern
Diplom, Juni 1983
seit Okt. 1983 Promotion unter Anleitung von
PD Dr. Werner Lubitz, Universität
Kaiserslautern
seit Jan. 1985 Institut für Genetik und Mikrobiologie,
Universität München

